

BEST AVAILABLE COPY

51457-2001600-10361

DELPHION

Log Out | Work Files | Saved Searches | My Account

RESEARCH

PROLOGUE

IMMEDIATE DELIVERY

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

Select CR

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)

Tools: Add to Work File:

Create new Work File

 Add

View: Jump to:

Top

 Go to: [Derwent](#)

☒ Email this to a friend

Title: CN1084219A: DETECTION OF NUCLEIC ACIDS

Derwent Title: Detection of, e.g., viral nucleic acids, human genes and other bio-molecules - by contacting cells or viruses with probe contg. reporter gp. [\[Derwent Record\]](#)

Country: CN China

Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection i

Inventor: MICHAEL LEE CUBBAGE; United States of America
JOEL BRESSER; United States of America
NAGINDRA PRASHAD; United States of America

Assignee: APROGENEX, INC. United States of America
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 1994-03-23 / 1993-07-17

Application Number: CN19939393116558

IPC Code: IPC-7: [C12Q 1/68](#); [C12Q 1/66](#); [C12Q 1/00](#); [C12N 15/02](#); [G01N 33/53](#);

ECLA Code: None

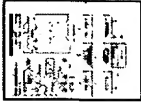
Priority Number: 1992-07-17 US1992000916183

Legal Status: INPADOC [Get Now: Family Legal Status Report](#)
























Designated Country: AT AU BB BG BR BY CA CH CZ DE DK EP ES FI GB HU JP KP KR KZ LK LU MG MN MW NL NO NZ
OA PL PT RO RU SD SE SK UA

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
				ANALOGUES OF REPORTER GROUPS AS BACKGROUND REDUCERS IN

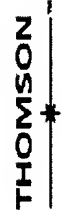
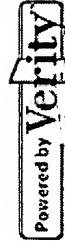


High Resolution

	WO9502699A1	1995-01-26	1994-01-14	HYBRIDIZATION ASSAYS
	WO9402644A1	1994-02-03	1993-07-16	IN SITU DETECTION OF NUCLEIC ACIDS USING 3SR AMPLIFICATION
	WO9402643A1	1994-02-03	1993-07-16	NUCLEIC ACID PROBES AND USES THEREOF TO DETECT DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS
	WO9402642A1	1994-02-03	1993-07-16	BACKGROUND-REDUCING COMPOUNDS FOR PROBE-MEDIATED IN-SITU FLUORIMETRIC ASSAYS
	WO9402641A1	1994-02-03	1993-07-16	ANALOGUES OF REPORTER GROUPS AS BACKGROUND REDUCERS IN HYBRIDIZATION ASSAYS
	WO9402640A1	1994-02-03	1993-07-16	MULTI REPORTER-LABELED NUCLEIC ACID PROBES
	WO9402639A1	1994-02-03	1993-07-16	ENHANCEMENT OF PROBE SIGNAL IN NUCLEIC ACID-MEDIATED IN-SITU HYBRIDIZATION STUDIES
	WO9402638A1	1994-02-03	1993-07-16	FREE RADICAL SCAVENGERS USEFUL FOR REDUCING AUTOFLUORESCENCE IN FIXED CELLS
	WO9402500A1	1994-02-03	1993-07-16	OLIGONUCLEOTIDE PROBES AND PRIMERS FOR DETECTING CHROMOSOMAL TRANSLOCATION
	US5665546	1997-09-09	1995-02-22	Free radical scavengers useful for reducing autofluorescence in fixed cells
	US5652093	1997-07-29	1996-03-25	Analogues of reporter groups as background reducers in binding assays
	US5582982	1996-12-10	1994-05-16	Background-reducing compounds for probe-mediated fluorimetric flow cytometric assays
	US5521061	1996-05-28	1992-07-17	Enhancement of probe signal in nucleic acid-mediated in-situ hybridization studies
	US5501952	1996-03-26	1994-01-14	Analogues of reporter groups as background reducers in hybridization assays
	MX9304354A1	1995-01-31	1993-07-19	DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS.
	IL0106381A0	1993-11-15	1993-07-18	DETECTION OF NUCLEIC ACIDS
	IL0106380A0	1993-11-15	1993-07-18	IN SITU DETECTION OF NUCLEIC ACIDS USING 3SR AMPLIFICATION
	IL0106379A0	1993-11-15	1993-07-18	OLIGONUCLEOTIDE PROBES AND PRIMERS FOR DETECTING CHROMOSOMAL TRANSLOCATION
	EP0673436A4	2002-04-24	1993-07-16	ENHANCEMENT OF PROBE SIGNAL IN NUCLEIC ACID-MEDIATED IN-SITU HYBRIDIZATION STUDIES
	EP0673436A1	1995-09-27	1993-07-16	ENHANCEMENT OF PROBE SIGNAL IN NUCLEIC ACID-MEDIATED IN-SITU HYBRIDIZATION STUDIES.
	EP0672185A4	1997-04-23	1993-07-16	NUCLEIC ACID PROBES AND USES THEREOF TO DETECT DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS.
	EP0672185A1	1995-09-20	1993-07-16	NUCLEIC ACID PROBES AND USES THEREOF TO DETECT DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS
	EP0662153A1	1995-07-12	1993-07-16	FREE RADICAL SCAVENGERS USEFUL FOR REDUCING

					AUTOFLUORESCENCE IN FIXED CELLS
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0662151A1	1995-07-12	1993-07-16		BACKGROUND-REDUCING COMPOUNDS FOR PROBE-MEDIATED IN-SITU FLUORIMETRIC ASSAYS
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1088261A	1994-06-22	1993-07-17		IN SITU DETECTION OF NUCLEIC ACIDS USING 3SR AMPLIFICATION
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1088260A	1994-06-22	1993-07-17		OLIGONUCLEOTIDE PROBES AND PRIMERS FOR DETECTING CHROMOSOMAL TRANSLOCATION
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1084219A	1994-03-23	1993-07-17		DETECTION OF NUCLEIC ACIDS
<input checked="" type="checkbox"/>	AU7135494A1	1995-02-13	1994-01-14		ANALOGUES OF REPORTER GROUPS AS BACKGROUND REDUCERS IN HYBRIDIZATION ASSAYS
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4775193A1	1994-02-14	1993-07-16		IN SITU DETECTION OF NUCLEIC ACIDS USING 3SR AMPLIFICATION
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4774593A1	1994-02-14	1993-07-16		MULTI REPORTER-LABELED NUCLEIC ACID PROBES
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4774293A1	1994-02-14	1993-07-16		OLIGONUCLEOTIDE PROBES AND PRIMERS FOR DETECTING CHROMOSOMAL TRANSLOCATION
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4774093A1	1994-02-14	1993-07-16		FREE RADICAL SCAVENGERS USEFUL FOR REDUCING AUTOFLUORESCENCE IN FIXED CELLS
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4681693A1	1994-02-14	1993-07-16		NUCLEIC ACID PROBES AND USES THEREOF TO DETECT DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4681393A1	1994-02-14	1993-07-16		BACKGROUND-REDUCING COMPOUNDS FOR PROBE-MEDIATED IN-SITU FLUORIMETRIC ASSAYS
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4681193A1	1994-02-14	1993-07-16		ANALOGUES OF REPORTER GROUPS AS BACKGROUND REDUCERS IN HYBRIDIZATION ASSAYS
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4680293A1	1994-02-14	1993-07-16		ENHANCEMENT OF PROBE SIGNAL IN NUCLEIC ACID-MEDIATED IN-SITU HYBRIDIZATION STUDIES
36 family members shown above					

Other Abstract
Info:



CHEMABS 120(17)210032J CHEMABS 120(19)237582A CHEMABS 120(19)239671C DERABS C94-048897 DERABS C94-048898 DERABS C94-048901



Nominate this for the Gallery...

Subscriptions | Web Seminars | Privacy | Terms & Conditions | Site Map | Contact Us | Help

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corporation

DELPHION

51457-2001600-10361

Select CR

RESEARCH PRODUCTS INSIDE DELPHION

Log Out Work Files Saved Searches

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

Derwent Record

Email this to a friend

View: Expand Details Go to: Delphion Integrated View Tools: Add to Work File: Create new Work File Add

Derwent Title: New nucleic acid hybridisation probes - comprises single-stranded nucleic acid with reporter moieties covalently linked to inter-nucleoside phosphorus atoms

Original Title: WO9402640A1: MULTI REPORTER-LABELED NUCLEIC ACID PROBES

Assignee: APROGENEX INC Non-standard company

Inventor: ASGARIM; BLICK M; BRESSER J; COLVIN D; CUBBAGE M L; JU S C; PRASHAD N; WEBER W D;

Accession/Update: 1994-048897 / 199736

IPC Code: C12Q 1/68 ; C12P 19/34 ; C12Q 1/70 ;

Derwent Classes: B04; D16;

Manual Codes: B04-B03C(Oligonucleotides) , B04-E01(Nucleic acid general and other) , B04-E05(Primers, probes) , B06-A03(Heterocyclic fused ring with more than 2 rings - sole hetero(s) oxygen) , B11-C07B3 (Fluorescence) , B11-C08E5(DNA hybridisation test methods, use of DNA probes) , B12-K04F(Tests involving DNA, hybridisation probes etc.) , D05-H09(Testing and detection [exc. bacteria, fungi, viruses]) , D05-H12D1(Primers, probes)

Derwent Abstract: (WO9402640A) Process of using a nucleic acid probe to detect a nucleic acid target is claimed, the probe comprising a single-stranded (SS) nucleic acid moiety and reporter moieties such that each of the reporter moieties is covalent linked by a linker moiety to an intervening atom linked to an internucleoside phosphorus atom of the nucleic acid moiety, the probe comprising a sequence of nucleosides complementary to a sequence of nucleosides in the target. The process comprises (a) incubating the probe and the target together in the same soln. so as to allow them to hybridise to each other and (b) detecting the presence of target-bound probe molecules by a detection method that detects the presence of the reporter (pref. fluorescein) moieties.

USE/Advantage - The probes are useful as diagnostic tools for the detection of nucleic acids of pathogenic viruses and microorganisms. They are also useful in screening assays for genetic defects. The probes provide increased sensitivity and for a given level of sensitivity to be reached, hybridisation conditions less detrimental to cell integrity need to be used. In an example, 200 mg of dried oligonucleotide was dissolved in 100 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 7, and mixed with a soln. of 1 mg of iodoacetamido-fluorescein in 100 ml of DMF and shaken overnight. The labelled oligonucleotide was pptd. with EtOH and 3 M sodium acetate and purified. A 25-mer specific for 28S RNA with sequence (I) was made with a single

sulphur atom between nucleosides 24 and 25. ATCAGAGTAGTGGTA TTTCACCGGC (I). Then (I) was labelled using the method and used as a probe to hybridise in situ to ribosomal RNA in H9 cells.

Dwg.0/0

Family:

PDF Patent	Pub. Date	Derwent Update	Pages	Language	IPC Code
 WO9402640A1 *	1994-02-03	199406	32	English	C12Q 1/68

Des. States: (N) AT AU BB BG BR BY CA CH CZ DE DK ES FI GB HU JP KP KR KZ LK LU MG MN MW NL NO NZ PL PT RO RU SD SE SK UA
(R) AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL OA PT SE

Local appls.: WO1993US0006682 Filed:1993-07-16 (93WO-US06682)

AU9347745A = 1994-02-14 199425 English C12Q 1/68

Local appls.: Based on WO09402640 (WO 9402640)
AU1993000047745 Filed:1993-07-16 (93AU-0047745)
WO1993US0006682 Filed:1993-07-16 (93WO-US06682)

INPADOC

[Show legal status actions](#)

Legal Status:

First Claim:

[Show all claims](#)

Priority Number:

Having thus described the invention, what is desired to protect by Letters Patent and hereby claim is:

Application Number	Filed	Original Title
US1992000915927	1992-07-17	

Chemical

[Show chemical indexing codes](#)

Indexing Codes:

Specific

[Show specific compounds](#)

Compound

Numbers:

Registry

Numbers:

01[M1]:1278P 1544S 1732U 1532P 1779P 0517U 0843U 1926S 1966S 1036U 0758U 1784U 1674U 1503U 1767U 1694S
1753U 1905U
02[M1]:1278P 1544S 1732U 1532P 1779P 0517U 0843U 1926S 1966S 1036U 0758U 1784U 1674U 1503U 1767U 1694S
1753U 1905U
03[M2]:1278P 1544S 1732U 1532P 1779P 0517U 0843U 1926S 1966S 1036U 0758U 1784U 1674U 1503U 1767U 1694S
1753U 1905U

Unlinked

1594U

Registry Numbers:

Citations:

PDF Patent	Original Title
US5166195	ANTISENSE INHIBITORS OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS PHOSPHOROTHIOATE

	OLIGONUCLEOTIDES
	Msg: 4.Jnl.Ref

Related
Accessions:

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C1994-022185	C		
<u>1997-042300</u>	R	199704	Measuring amt. of target molecules in biological entity such a cell or virus - by using background-reducing cpds. such as Naphthol Blue Black in probe-mediated fluorimetric flow cytometric assays
<u>1995-067342</u>	R	199509	Assays for target molecules in cell or viruses - using analogues of reporter gps. as background reducers
<u>1994-048900</u>	R	199406	Detection of double-stranded nucleic acids - by hybridisation assay using probes complementary to each strand
<u>1994-048896</u>	R	199406	Assays using nucleic acid or antibody probes - with addn. of organic cpds. as signal enhancers
<u>1994-048785</u>	R	199406	Oligonucleotides for detecting chromosomal translocations - with sequence complementary to translocation junction-spanning nucleic acid segment
<u>1994-048898</u>	R	199406	Detection of, e.g., viral nucleic acids, human genes and other bio-molecules - by contacting cells or viruses with probe contg. reporter gp.
<u>1994-048901</u>	R	199406	Detection of RNA in cells or viruses - by means of in-situ 3SR amplification
<u>1994-048895</u>	R	199406	Fluorimetric process for assaying, e.g., cells, or viral nucleic acids, antigens, etc. - includes addn. of free radical scavenger to reduce background autofluorescence
<u>1994-048899</u>	R	199406	Improved fluorimetric assay using background-reducing cpds. - leads to decreased non-specific emission of light and decreased auto-fluorescence
10 items found			

Title Terms:

NEW NUCLEIC ACID HYBRID PROBE COMPRISE SINGLE STRAND NUCLEIC ACID REPORT MOIETY COVALENT LINK INTER NUCLEOSIDE PHOSPHORUS ATOM

Pricing Current charges

Derwent Searches: Boolean | Accession/Number | Advanced

Data copyright Thomson Derwent 2003

THOMSON

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corporation

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1084219A



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93116558.X

[51]Int.Cl⁵

C12Q 1/68

[43]公开日 1994 年 3 月 23 日

[22]申请日 93.7.17

[30]优先权

[32]92.7.17 [33]US[31]915,927

[32]92.7.17 [33]US[31]915,894

[32]92.7.17 [33]US[31]915,893

[32]92.7.17 [33]US[31]916,068

[32]92.7.17 [33]US[31]915,900

[32]92.7.17 [33]US[31]916,183

[71]申请人 阿普罗精内斯有限公司

地址 美国得克萨斯州

[72]发明人 M·L·库比治 N·普拉沙

W·D·韦伯 M·阿斯加里

J·布雷泽 M·布里克 S·C·祝

D·科尔文 祖尔苏克

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

C12Q 1/66 C12Q 1/00

C12N 15/02 G01N 33/53

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 核酸的检测

[57]摘要

本发明公开了改善核酸杂交,特别是原位杂交之速度和/或敏感性的方法及组合物,包括通透增强剂、用于增强荧光探针信号的信号增强剂,本底降低剂、带有多个报告物基团的探针及针对两条靶链的探针群体。

(BJ)第 1456 号

1. 检测生物实体中靶分子的方法，该方法包括以下步骤：

(1) 将生物实体与含有探针分子的试验溶液接触，以使探针分子结合到靶分子上，并

(2) 在其结合到靶分子上后检测该探针分子，

所说的试验溶液含有探针分子和选自二甲基亚砷 (“DMSO”) 醇、脂族烷烃、烯烃、环糊精、脂肪酸酯、酰胺和内酰胺，以及有机硅烷这一类化合物。

所说的探针分子是核酸探针或抗体探针，

所说的生物实体是细胞或病毒。

2. 根据权利要求1的方法，其中靶分子是核酸分子，试验溶液含有核酸探针和DMSO (2-20%) 和一种或多种选自下列一组中的化合物：醇 (2-20%)、脂族烷烃 (2-20%)、烯烃 (2-20%)、环糊精 (2-20%)、式 $R_1 (COO) R_2$ 的脂肪酸酯 (2-20%)、式 $R_3 (NH) (CO) R_4$ 的酰胺或内酰胺 (2-15%)、以及式

$(SiR_5 R_6 R_7) N (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、

$(SiR_5 R_6 R_7) - (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、

$(SiR_5 R_6 R_7) O (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、或

$(SiR_5 R_6 O) (SiR_7 R_8 O) (SiR_9 R_{10} O)$ 的有机硅烷 (2-20%)，DMSO与选自该组中之化合物的合并体积不超过试验溶液的30% (V/V)，

其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 是烷基部分， R_1 和 R_2 可以共价连接形成环结构， R_3 和 R_4 也可以共价连接形成环结构，且化合物后括号内标示的百分比是指以占试验溶液的百分比表示的化合物的浓度。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中醇具有 2 至 40 个碳原子；脂族烷烃具有 10 至 60 个碳原子；烯烃具有 10 至 60 个碳原子； R_1 加 R_2 一起具有 3 至 20 个碳原子，若 R_1 和 R_2 没有共价结合形成环时， R_1 和 R_2 各有至少 1 个碳原子； R_3 加 R_4 一起具有 2 至 20 个碳原子，若 R_3 和 R_4 没有共价结合形成环时， R_3 和 R_4 各有至少 1 个碳原子； R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 各有至少 1 个碳原子；六个烷基碳结构， R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 一起具有不超过 20 个碳原子。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中除了 DMSO 和烷烃或烯烃外，至少还有另一种选自该组中的化合物。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中包括烷烃和至少一种选自该组的其他化合物。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中 DMSO 和选自该组中的化合物的合并体积不超过试验溶液的 20% (V/V)。

7. 检测生物实体中靶分子的方法，该方法包括下列步骤：

(1) 将生物实体与含有探针分子的试验溶液接触，以使探针分子结合至靶分子上，

(2) 从试验溶液中除去生物实体，

(3) 将增强信号化合物加到悬浮生物实体的溶液中，并

(4) 检测作为信号的由靶结合的探针分子直接或间接产生

的光量子，

所说的增强信号化合物选自醇、脂族烷烃、糖、脂肪酸酯、酰胺或内酰胺，及有机硅烷这一类化合物，

其中所说的生物实体是细胞或病毒。

8. 根据权利要求7的方法，其中光量子是由靶结合的探针分子直接产生的。

9. 根据权利要求7的方法，其中在进行步骤(4)时将增强信号化合物加到悬浮有生物实体的溶液中。

10. 根据权利要求7的方法，其中探针分子包括荧光部分并且在步骤(4)中检测的光量子是由该部分发射的。

11. 检测生物实体中靶分子的药盒，所说的药盒包含探针分子和选自DMSO、醇、脂族烷烃、烯烃、环糊精、脂肪酸酯、酰胺和内酰胺，以及有机硅烷这类化合物，所说的探针分子是核酸探针或抗体探针。

12. 检测生物实体中核酸靶分子的方法，该方法包括以下步骤：

(1) 将生物实体与含有酶分子的试验溶液接触，以使酶分子结合到靶分子上，并，

(2) 使酶催化反应，

所说的试验溶液含有酶和选自下组：

脂族烷烃、烯烃、环糊精、脂肪酸酯、酰胺或内酰胺，以及有机硅烷的化合物，

所说的酶选自DNA聚合酶、RNA聚合酶、反向转录酶、RNase H、DNA连接酶和RNA复制酶这一类酶，

所说的生物实体是细胞或病毒。

13. 根据权利要求12的方法, 其中试验溶液包含选自该组的酶和DMSO (2-20%) 和一种或多种选自下列一组中的化合物, 即醇 (2-20%)、脂族烷烃 (2-20%)、烯烃 (2-20%)、环糊精 (2-20%)、式 $R_1 (COO) R_2$ 的脂肪酸酯 (2-20%)、或 $R_3 (NH) (CO) R_4$ 的酰胺或内酰胺 (2-15%)、式 $(SiR_5 R_6 R_7) N (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、 $(SiR_5 R_6 R_7) - (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、 $(SiR_5 R_6 R_7) O (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、或 $(SiR_5 R_6 O) (SiR_7 R_8 O) (SiR_9 R_{10} O)$ 的有机硅烷 (2-20%), DMSO 和选自该组中之化合物的合并体积不超过试验溶液的30% (V/V),

其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 是烷基部分, R_1 和 R_2 可以共价结合成环结构, R_3 和 R_4 也可以共价结合成环结构, 而化合物之后的括号内标示的百分比是指以占试验溶液的百分比 (V/V) 表示的化合物的浓度。

14. 根据权利要求13的方法, 其中醇具有2至40个碳原子; 脂族烷烃具有10至60个碳原子; 烯烃具有10至60个碳原子; R_1 加 R_2 一起共有3至20个碳原子, 若 R_1 和 R_2 没有共价连接形成环时, R_1 和 R_2 各有至少1个碳原子; R_3 加 R_4 一起有2至20个碳原子, 如 R_3 和 R_4 没有共价连接形成环, 则 R_3 和 R_4 各有至少1个碳原子; R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 各有至少1个碳原子; 这6个烷基碳结构, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 一起有不超过20个碳原子。

15. 根据权利要求12的方法, 其中除了DMSO、烷烃或烯

烃外，至少还有一种选自该组的其他化合物。

1 6 . 根据权利要求 1 5 的方法，其中包括烷烃和至少一种选自该组的其他化合物。

1 7 . 测量生物实体中靶分子的量的方法，该方法包括以下步骤：

(1) 将生物实体与溶液中的荧光探针一起保温，

(2) 从溶液中除去生物实体，

(3) 使生物实体于荧光探针之吸收波长处曝光，并

(4) 测量以荧光探针之发射波长发射的光的量；

其中在步骤 (1) 开始之后和步骤 (4) 终止之前，在悬浮有生物实体的溶液内存在降低本底化合物。

其中所说的生物实体是细胞或病毒，

所说的降低本底化合物含有结构不同于荧光探针之荧光染料部分的吸收光部分，

所说的降低本底化合物具有包括荧光探针的发射波长 (在步骤

(4) 中于该波长处测量光的量) 在内的吸收波长范围。

1 8 . 根据权利要求 1 7 的方法，其中荧光探针包括抗体部分或核酸部分。

1 9 . 根据权利要求 1 7 的方法，其中在步骤 (4) 期间存在降低本底化合物。

2 0 . 根据权利要求 1 7 的方法，在权利要求所述的步骤 (2) 和 (3) 之间，该方法进一步包括一个在无探针溶液中洗细胞的步骤。

2 1 . 根据权利要求 1 7 的方法，其中探针包括单链核酸部分。

2 2 . 根据权利要求 1 7 的方法，其中荧光探针染料包括荧光素部分。

23. 包含荧光标记的探针和降低本底化合物的药盒，其中探针的发射波长与降低本底化合物的吸收波长相同。

24. 荧光检测方法，该方法包括以下步骤：

(1) 使生物实体与含有能移结合所说生物体内或其上之靶分子的荧光探针的溶液接触，所说的接触是以一种能使荧光探针结合到所说的靶分子上，从而使该探针变为结合生物实体的探针的方法完成的。

(2) 使此生物实体与含有游离基清除剂的溶液接触。

(3) 使生物实体结合的探针吸收所说生物实体结合之探针的荧光吸收波长处的光，并

(4) 检测所说生物实体结合之探针的荧光发射波长处的光，

其中步骤(1)发生在步骤(2)之前，步骤(2)之后或步骤(2)期间，

其中所说的生物实体是细胞或病毒。

25. 根据权利要求24的方法，其中游离基清除剂具有维生素E的至少20%的清除效率。

26. 根据权利要求24的方法，其中使荧光探针和游离基清除剂包括于同一溶液中，而同时完成步骤(1)和(2)。

27. 根据权利要求24的方法，该方法还在步骤(2)和(3)之间进一步包括一个洗涤步骤，所说的洗涤步骤包括在无探针溶液中洗生物实体。

28. 根据权利要求24的方法，其中在步骤(1)之前已用固定液处理过生物实体。

29. 根据权利要求24的方法，其中荧光探针是荧光染料与核酸分子共价结合的。

30. 根据权利要求29的方法, 其中荧光探针具有荧光素部分。

31. 根据权利要求29的方法, 其中靶是人免疫缺陷病毒RNA或DNA。

32. 包含荧光探针和游离基清除剂的溶液, 所说的探针包括核酸部分或抗体部分。

33. 包含荧光探针和游离基清除剂的药盒, 所说的探针包括核酸部分或抗体部分。

34. 使用核酸探针检测核酸靶的方法,

所说的探针包括单股核酸部分和多个报告物部分, 而且使各个所说的报告物部分借助接头部分共价连接到一个中介原子上, 该中介原子连接到所说核酸部分之核苷间磷原子上;

所说的探针包括互补于所说的靶中之核苷序列的核苷序列;

所说的方法包括以下步骤:

(1) 将探针和靶一起在同一溶液中保温, 以使它们相互杂交, 并

(2) 用一种检测是否存在所说报告物部分的检测方法检测是否存在与靶结合的探针分子。

35. 根据权利要求34的方法, 其中靶是在生物实体中, 且所说的生物实体是细胞或病毒。

36. 根据权利要求34的方法, 其中探针包含单股DNA部分。

37. 根据权利要求34的方法, 其中各报告物部分均包括有环结构, 且所说的环结构和核苷间磷原子之间的分隔长度至少是两个原子。

38. 根据权利要求34的方法, 其中分隔两个报告物部分连接

之核酸磷原子的平均核苷数至少是4。

3.9. 根据权利要求3.4的方法，其中中间介入原子选自氧原子、硫原子和氮原子这类原子。

4.0. 根据权利要求3.5的方法，其中探针包含多个报告物部分，即荧光染料部分。

4.1. 根据权利要求4.0的方法，其中步骤(2)借用流式细胞计数器完成。

4.2. 根据权利要求4.0的方法，其中步骤(2)是借助配有荧光检测装置的显微镜完成的。

4.3. 根据权利要求4.0的方法，其中荧光染料部分是荧光素部分。

4.4. 包含单股寡核苷酸分子和多个报告物部分的探针，其中各个所说的报告物部分借助接头部分共价连接到中介原子上，后者又连接到寡核苷酸的核苷间磷原子上。

4.5. 用于检测生物实体内核酸分子的药盒，所说的药盒包含权利要求4.4的探针和附加的用在溶液中，使所说的探针群体与所说生物实体反应，从而可在探针群体的分子和生物实体内核酸分子之间形成杂交体分子的试剂。

4.6. 一种检测方法，该方法包括以下步骤：

(1) 使生物实体与含有能够结合所说生物实体中或其上之靶分子的探针的溶液接触，所说的接触是以使探针与所说靶分子结合从而致使探针成为生物实体结合的探针的方法完成的，所说的探针包含报告物基团，

(2) 使该生物实体与含有与报告物基团之结构为类似物的溶液

接触，

(3) 完成一个或多个检测与生物实体结合之探针上的报告物基团，但不检测与生物实体结合之类似物的步骤，

其中步骤(1)发生在步骤(2)之前，步骤(2)之后或步骤(2)期间，

其中所说的生物实体是细胞或病毒。

47. 根据权利要求46的方法，其中报告物基团是环状化合物。

48. 根据权利要求47的方法，其中环状化合物的环部分包括不饱和键。

49. 根据权利要求48的方法，其中环状化合物是芳族化合物。

50. 根据权利要求46的方法，其中所说的探针包括核酸部分或抗体部分。

51. 根据权利要求46的方法，其中使探针和类似物包括于同一溶液中而同时完成步骤(1)和(2)。

52. 根据权利要求46的方法，其中报告物基团是荧光部分且步骤(3)包括用荧光检测法检测所说的报告物基团。

53. 根据权利要求46的方法，其中报告物基团可参预化学发光反应，并且所说的步骤(3)包括用化学发光检测法检测所说报告物基团。

54. 根据权利要求46的方法，该方法在步骤(2)和(3)之间还包括洗涤步骤，所说的洗涤步骤包括在无探针溶液中洗生物实体。

55. 根据权利要求46的方法，其中在步骤(1)之前已用固定液处理了生物实体。

56. 根据权利要求53的方法，其中荧光部分是荧光素。
57. 根据权利要求46的方法，其中探针是对病毒核酸特异的。
58. 根据权利要求46的方法，其中靶是人免疫缺陷病毒RNA或DNA。

59. 根据权利要求52的方法，其中报告物基团选自荧光素、德克萨斯红、香豆素、若丹明或若丹明衍生物、藻红素和 Peri - P 这类物质。

60. 根据权利要求59的方法，其中报告物基团是荧光素或若丹明衍生物，且类似物是金精或其衍生物。

61. 根据权利要求60的方法，其中报告物基团是荧光素且类似物是金精或其衍生物。

62. 根据权利要求61的方法，其中类似物是金精三羧酸。

63. 根据权利要求62的方法，其中报告物部分是异鲁米诺 (isoluminol)。

64. 一种检测方法，该方法包括以下步骤：

(1) 使靶分子与含有能够与所说靶分子结合之探针的溶液接触，所说的接触是以一种使探针结合到所说靶分子上的方式完成的，所说的探针包括报告物基团，

(2) 使靶分子与含有报告物基团之结构类似物的溶液接触，

(3) 完成一个或多个检测与靶分子结合之探针上的报告物基团，但不检测结合到生物实体上之类似物的步骤，

其中步骤(1)发生在步骤(2)之前，步骤(2)之后或步骤(2)期间。

65. 包含有下列组分的溶液：

1) 含报告物基团并进一步包含抗体或核酸部分的探针, 以及

2) 所说报告物基团的结构类似物。

6 6. 包含下列组分的药盒:

1) 包括报告物基团并进一步包含抗体或核酸部分的探针, 以及

2) 所说报告物基团的结构类似物。

6 7. 检测双股核酸靶的方法, 该方法包括下列步骤:

(1) 分离靶分子的链, 足以使它们各自与具有互补核苷酸序列的核酸探针杂交;

(2) 将充分分离的靶链与核酸探针群体共保温, 所说核酸探针群体包括核苷酸序列互补于一条靶链的分子和核苷酸序列互补了另一条靶链的分子, 并且

(3) 检测与靶分子杂交的核酸探针分子;

其中在允许靶的各链与其中核苷酸序列互补于该靶链的核酸探针分子形成杂交体的条件下完成步骤(2);

其中对于各探针分子的核苷酸序列来说, 在靶链中有一总的互补序列;

其中, 各探针分子在核苷酸序列上部分地互补于至少一个其他探针分子;

其中没有两个探针分子的核苷酸序列彼此完全互补;

其中若一个探针分子的一部分核苷酸序列互补于另一个探针分子, 则该部分长度很短使其在步骤(2)的条件下不能与其他探针分子杂交。

6 8. 根据权利要求 6 7 的方法, 其中探针分子具有这样的核苷酸序列, 即当靶的一条链饱和了探针分子时, 则探针分子间没有形成

缺口的未杂交靶链序列。

6.9. 根据权利要求6.7的方法, 其中两靶链定位于生物实体中, 且其中所说的生物实体是细胞或病毒。

7.0. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或6.7的方法, 其中生物实体是细胞。

7.1. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或6.7的方法, 其中细胞是人细胞。

7.2. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或6.7的方法, 其中生物实体是病毒。

7.3. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或6.7的方法, 其中生物实体被悬浮在溶液中而不是固定在固相载体上。

7.4. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或6.7的方法, 其中生物实体被固定在固相载体上。

7.5. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或6.7的方法, 其中生物实体是组织切片或取自多细胞生物实体之组织学切片的一部分。

7.6. 根据权利要求6.7的方法, 其中各探针分子均包含可检测的标记。

7.7. 根据权利要求7.6的方法, 其中可检测标记是荧光染料分子。

7.8. 根据权利要求6.7的方法, 其中两条靶链都是纯化的核酸。

7.9. 根据权利要求7.8的方法, 其中两条靶链在该方法步骤(2)期间均固定于固相载体上。

8.0. 根据权利要求6.7的方法, 其中各探针分子核苷酸序列,

互补于至少一个其它探针分子中，长度不小于约12个核苷酸，但不大于约100个核苷酸的序列。

81. 根据权利要求80的方法，其中各探针分子互补于至少一个其他探针分子中的长度不小于约12个核苷酸，但不大于20个核苷酸的序列。

82. 根据权利要求81的方法，其中互补于至少一个其他探针分子中之序列的各探针分子长度约为12个核苷酸。

83. 根据权利要求67的方法，其中各探针的长度约在15个核苷酸和100个核苷酸之间。

84. 根据权利要求67的方法，其中各探针的长度在大约15个核苷酸和40个核苷酸之间。

85. 根据权利要求67的方法，其中各探针的长度约为25个核苷酸。

86. 根据权利要求67的方法，其中双股靶具第一条靶链和第二条靶链，且其中核苷酸序列互补于第一条靶链的探针分子，具有结构上不同于核苷酸序列互补于第二条靶链之探针分子上的可检测标记的可检测标记。

87. 根据权利要求86的方法，其中双股靶是DNA靶，且其中核苷酸序列互补于第一条靶链的探针分子，核苷酸序列也互补于细胞RNA分子。

88. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或67的方法，其中靶是病毒DNA或RNA。

89. 核苷酸探针群体，其中

1) 各核酸探针分子的长度大约在15个核苷酸和大约100个

核苷酸之间，

2.) 没有探针分子的核苷酸序列完全互补于另一个探针分子，且

3.) 各探针分子核苷酸序列至少部分地互补于至少一个其他探针分子。

90. 检测生物实体中核酸分子的药盒，所说的药盒包括权利要求89的探针群体，以及用在溶液中使所说探针群体与所说的生物实体反应的附加试剂。从而可使探针群体和生物实体中的核酸分子之间形成杂交体分子。

91. 根据权利要求1、8、12、17、24、35、46或67的方法，其中靶是人免疫缺陷病毒DNA或RNA。

核 酸 的 检 测

本发明涉及通过核酸探针检测核酸。

使用特异性核酸探针，通过探针与有关核酸分子反应的杂交反应来检测预示感染其他疾病及遗传紊乱的细胞和病毒核酸分子。一个特别有用的方法是在原位使用这样的杂交反应，即其中被分析的细胞或病毒保持完整，并且杂交反应发生在细胞内。但在多数情况下待测核酸分子的大小或拷贝数很小。

本发明使用一个或多个下述发明改善杂交方法（特别是原位）的速度和/或敏感性：杂交期间的渗透增强剂、增强荧光探针信号的信号增强剂、探针之荧光检测期间的本底降低剂、减少本底荧光的游离基清除剂、各探针的多报告物基团，降低杂交本底之报告基团的类似物，以及探针针对双股靶的应用。

“分析物分子”是指所设计的检测法欲检测的分子。

“扩增分子”是指使用扩增方法产生的核酸分子。其具有互补于全部或部分分析物分子的核苷酸序列或具有等同于全部或部分分析物分子的核苷酸序列。

“探针”是指包含寡核苷酸且通常还有报告物部分的分子，其中报告物是可检测的，且寡核苷酸可与核酸分子杂交。报告物部分可以是放射活性物质、荧光材料、化学发光剂、酶（如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或催化显色反应的其他酶）或可与直接连接到可检测部分

如放射活性物，荧光物质，化学发光剂或酶上的配体特异性连结分子（例如链霉抗生物素蛋白（streptavidin）发生特异性反应的配体（例如生物素）。

如果按“Watson - Crick”碱基配对规则定义两序列的关系，则第一个核苷酸序列互补于第二个核苷酸序列：一个序列中有鸟嘌呤（G），另一个序列中便有胞嘧啶（C），而一个序列中有腺嘌呤（A）则另一个序列中便有胸腺嘧啶（T）或尿嘌呤（U）。

“杂交体”是指由两个核酸分子形成的双股（或部分双股）分子，其中一个分子具有互补于另一分子中之序列的核苷酸序列。

如果两个核苷酸序列完全相同，或者除了一个序列是DNA序列而另一个序列是RNA序列，其中RNA序列中的尿嘧啶取代了胸腺嘧啶外而序列完全相同时，则认为第一个核苷酸序列是第二个核苷酸序列的“等同物”。

当两个染色体片段因转位而接合在一起形成一个新的染色体时，则两片段接在一起的这一点即为“染色体转位接合点”。

“核苷酸序列”这一术语也包括其中在某些正常情况下存在磷的位置上有某些磷以外之原子（如硫）的序列。

“引物”是指可借助酶而延伸成较长分子的寡核苷酸。

“原位”是一个用来描述发生于基本上完整的细胞或病毒内之过程的术语；细胞或病毒常常是已用许多但并非所有本文定名的交联或沉淀固定剂处理的。

本文所说的“生物实体”是指细胞或病毒。

针对双股靶的探针

对任何单股分子对而言，如果一个分子内具有互补于第二个分子

中核苷酸序列的核苷酸序列，且这两个序列有N个核苷酸长（各分子的总长度可大于N），则两分子只在N比某一临界值更大时形成杂交体。临界值部分地取决于杂交条件（温度，所选择的溶剂等），又部分地取决于互补序列的核苷酸组成。

从下列实施例中所举的实验例子中，可以看出临界值是在12和23之间。在这些实施例中令探针分子的长度为大约24核苷酸，且不使任何探针分子对的N超过12的情况下，即可得到与双股靶序列杂交的有效探针群体。因为可得到用一股探针所得的约两倍信号，所以该探针群是有效的。

可通过改变杂交条件和/或探针分子的碱基序列来改变N的临界值。这一点可从本文所给出的实施例中得以证实。然而，根据按下述原理进行的常规实验，可以从中确定任何一组杂交条件下的临界值，并进而完成本发明的方法。

一方面，本发明涉及检测双股核苷酸靶的方法，该方法包括以下步骤：

（1）分离足以使每个均与互补核苷酸序列的核酸探针杂交的靶核苷酸链；

（2）使充分分离的靶链与核酸探针群体共保温，所说的探针群体包括核苷酸序列互补于一条靶链的分子和核苷酸序列互补于另一条靶链的分子，以及

（3）检测与靶分子杂交的核酸探针分子；

这样便可以允许各靶链与核苷酸序列互补于该靶链的核酸探针形成杂交体的条件下完成步骤（2）；

这样对于各核酸探针的核苷酸序列来说就存在靶链中有一总的互

补序列；

这样各核酸探针分子在核苷酸序列上与至少一个其他核酸探针分子部份互补；

这样没有两个核酸探针分子的核苷酸序列相互是完全互补的。

这样当一个核酸探针分子的一部分在核苷酸序列上互补于另一个核酸探针分子时，那么该部份具有为在步骤（2）的条件下与另一个核酸探针分子杂交显得太短的长度。

术语“核苷酸序列”欲包括在核苷酸内正常情况下应存在磷的某些位置上有些磷以外之原子（如硫）的序列。在这种情况下，人们可以说两个分子就核苷酸序列来说是互补的，因为有关核苷酸序列是互补的，或者可以简单地就说就核苷酸序列来说是互补的。

一般可用可检测的标记物如放射活性物（如用 ^{32}P ），染料分子如荧光素，或可进入化学发光反应的部份来标记探针分子。

在本方法的一个一般性方案中，两条靶链位于作为生物实体的细胞或病毒内。可将细胞或病毒悬浮于溶液中而不固定于固相载体上。另一方面，也可将细胞或病毒固定于固相载体上。细胞或病毒可以是组织切片（组织学切片）的一部分。

含有靶核酸分子的细胞可以是真核细胞（如人细胞）、原核细胞（如细菌）、植物细胞或任何其他类型的细胞。它们可以是简单的真核细胞如酵母，或者是由复杂的真核生物如人体内得到的。

核酸的靶链可以在非包膜的病毒中或在包膜的病毒（具有非包封的膜如脂蛋白膜）中。

在本方法的一个方案中，探针群体中的多数分子各自直接地或通过交联物分子连接到荧光染料分子上。

在该方法中，两条靶链可以是纯化的核酸。它可能是已从病毒、细胞或多细胞生物体中提取出来的。

在步骤（2）中，两条靶链可固定在固相载体（如硝酸纤维素滤纸或尼龙膜片）上。另外，它们也可以是在溶液中而不固定于固相载体上。

在该方法中，靶链可以是DNA链。如果是从病毒（例如人免疫缺陷病毒）得到的靶链也可以是RNA，此时互补于另一探针分子的互补RNA长度不小于约12个核苷酸，但不大于约20个核苷酸。在该方法中一特别优选的方案中，与另一探针分子互补的探针分子该部分的长度约为12个核苷酸。

在上述方法的具体实施方案中，双股靶分子具有第一靶链和第二靶链，而且其中核苷酸序列互补于第一条靶链的探针分子有可检测标记，其可检测标记结构上不同于互补于第二条靶链的探针分子上的可检测标记。例如，核苷酸序列互补于第一条靶链的探针分子上的可检测标记可以是荧光染料，互补于第二条靶链的探针分子上的可检测标记则也可以是荧光染料。在一特定实施方案中，其中双股靶是DNA靶，核苷酸序列互补于第一股靶链的探针分子核苷酸序列也互补于细胞RNA分子。后一特定方案的一个有用的例子是，可能在有用靶细胞中有双股DNA病毒基因组（或RNA病毒基因组的反转录酶DNA拷贝）。如果真的有这样一个基因组存在，那么可能有或不可能有从这一基因组转录的RNA存在。从临床角度看，不仅了解是否DNA基因组存在是有用的，而且了解是否基因组表达为RNA或基因组的其它RNA拷贝也是临床上有用的。如果没有病毒RNA（或其他RNA）存在，则由针对反意义链的探针检测出的核酸量将

等于由针对有意义链的探针检测出的核酸量。如果还存在病毒 mRNA，则由针对有意义DNA链的探针检测出的核酸量将超过由针对反意义DNA链的探针检测出的核酸量。此多余量是由于存在有 mRNA。实际上校准针对已知量病毒RNA和病毒DNA的探针，使得由给定量已杂交探针给出的荧光量是已知的，则可根据其结果计算出存在于试验样品中的病毒RNA和病毒DNA的量（总质量），并考虑RNA和DNA靶的分子量，计算出每份试样及其每个细胞中RNA分子拷贝数和病毒DNA的拷贝数。

如果实施例4和7所遵循的策略中使用各有4个氟的30mers并用在玻片上的细胞进行杂交，而且使用足够的30mers包盖靶双链，则在即使靶序列短至750碱基对并且用显微镜以肉眼观察荧光的情况下，或在靶序列短到75至150个碱基对并使用影象分析系统检测的情况下都能检测出单个细胞中的靶的单个拷贝。

双股靶可以是细胞DNA，细胞RNA，病毒DNA或病毒RNA。

除了本发明的各种方法外，本文还公开了包括所有特定和优选实施方案在内的核酸探针群体在这些方法中的应用。

相关发明是用于上述本发明方法中的探针群体。一个实例是核酸探针群体，其中

- 1). 各探针分子的长度在大约15至100个核苷酸之间，
- 2). 没有探针分子的核苷酸序列完全与另一探针互补，并且
- 3). 各探针分子至少部分地在核苷酸序列上互补于至少一个其他的探针分子。

通透增强剂和信号增强剂

本发明的一个方面是涉及通透增强剂修饰检测生物实体（细胞或病毒）中靶分子的方法，该方法包括以下步骤：

（1）使生物实体与含有探针分子的试验溶液接触，从而使得探针分子与靶分子结合，并

（2）在其结合到靶分子上之后检测探针分子，

所说的试验溶液含有探针分子和选自二甲基亚砷（“DMSO”）醇、脂族烷烃、烯烃、环糊精、脂肪酸酯、酰胺或内酰胺。以及有机硅烷这类化合物。所说的探针分子是核酸探针或抗体探针。

如果将该组中的化合物加到试验溶液中，大大增强最后观察到的信号，这一事实表明这样的化合物即是通透增强剂。基于这一点，将上文所述的方法称为“通透增强剂修饰的”方法。该名称用于将其与下面描述的“信号增强剂修饰的”方法区分开，后一方法，是在从试验溶液中除去细胞或病毒后加入增强化合物，具体是在本检测法的最后步骤即荧光检测期间加入增强化合物。

在通透增强剂修饰的方法的优选实施方案中，试验溶液含有核酸探针和DMSO（2-20%）及一种或多种选自下列一组中的化合物：醇（2-20%）、脂族烷烃（2-20%）、烯烃（2-20%）、环糊精（2-20%），式 $R_1(COO)R_2$ 的脂肪酸酯（2-20%），式 $R_3(NH)(CO)R_4$ 的酰胺或内酰胺（2-15%），和式 $(SiR_5R_6R_7)N(SiR_8R_9R_{10})$ 、 $(SiR_5R_6R_7)-(SiR_8R_9R_{10})$ 、 $(SiR_5R_6R_7)O(SiR_8R_9R_{10})$ 或 $(SiR_5R_6O)(SiR_7R_8O)(SiR_9R_{10}O)$ 的有机

硅烷 (2 - 20 %), 而 DMSO 和选自该组中的化合物合并体积不超过试验溶液 30 % (V / V)。

有关通透增强剂修饰的方法的一个结合方案, 试验溶液含有核酸探针和 DMSO (2 - 20 %) 以及一种或多种选自下列一组的化合物: 醇 (2 - 20 %)、脂族烷烃 (2 - 20 %)、烯烃 (2 - 20 %)、环糊精 (2 - 20 %), 式 $R_1 (COO) R_2$ 的脂肪酸酯 (2 - 20 %), 式 $R_3 (NH) (CO) R_4$ 的酰胺或内酰胺 (2 - 15 %), 和式 $(SiR_5 R_6 R_7) N (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、 $(SiR_5 R_6 R_7) - (SiR_8 R_9 R_{10})$ 、 $(SiR_5 R_6 R_7) O (SiR_8 R_9 R_{10})$ 或 $(SiR_5 R_6 O) (SiR_7 R_8 O) (SiR_9 R_{10} O)$ 的有机硅烷 (2 - 20 %), DMSO 和选自该组中的化合物合并体积不超过试验溶液 30 % (V / V)。

在另一改变的通透增强剂修饰的方法中, 除了 DMSO 以外, 还有烯烃或优选烷烃, 以及至少一种选自该组中的其他化合物。优选的结构是如上文所述的优选结构。

在通透增强剂修饰的方法的特定实施方案中, 试验溶液含有约 10 % Triton X-100 (V / V)。

上面特定的各试验溶液也是一个发明。

在通透增强剂修饰的方法的一个特定实施方案中, 从该组选择的化合物只是 DMSO, 且 DMSO 的体积为试验溶液的 2 - 20 % (V / V); 特别优选的 DMSO 体积为大约试验溶液的 10 % (V / V)。化合物浓度最好保持在足够低的水平, 这样它们便不会从溶液中沉淀出来, 而且在试验溶液中也没有其他化合物的沉淀物。当以

1.0%或更高浓度加入时,烷烃特别是异三十烷和结构上与之相似或大于异三十烷的烷烃,以及醇特别是油醇和结构上与之相似或大于油醇的醇,根据其它存在的成份,而可能部份从检测溶液中沉淀出来。

优选的化合物包括异三十烷、十二烷醇、 β -环糊精、棕榈酸异丙酯、1,2-丙二醇、六甲基二硅氧烷,以及油醇、吡咯烷酮 (pyrrolidinone) 和异三十烷。优选的组合是大约10% DMSO 加大约10%吡咯烷酮。另一优选的组合是大约10% DMSO 加大约5%异三十烷和5%吡咯烷酮。

检测靶分子的通透增强剂修饰方法,有一个不同的实施方案,其中细胞(如固定化细胞)被制备成对于在细胞扩增方法如聚合酶链反应法(PCR,参见PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, M. A. Innis et al., Eds., Academic Press, San Diego, California),以转录为基础的扩增系统(TAS; Kwok, D. Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173, 1989), 3SR (Guatelli, J. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1874, 1990), 连接扩增反应/以连接为基础的扩增系统(LAR/LAS; Barringer, K. J. et al., Gene 89: 117, 1990)及RNA复制系统(如QB系统; Lizardi, P. M. et al., Bio/Technology, 6, 1197, 1988)中沉淀的酶来说更易于渗透。

这些扩增反应中所用酶分别是PCR方法中的DNA聚合酶(特别是Taq聚合酶)、TAS和3SR系统中的RNA聚合酶(如T7 RNA聚合酶)和反向转录酶(如禽类成髓细胞瘤病毒反向转录酶), 3SR系统中的RNAase H, LAR/LAS系统中的

DNA连接酶（如E. coli DNA连接酶）以及RNA复制系统中的RNA复制酶（如RNA噬菌体Q β 复制酶）。

为此，作为通透增强剂修饰方法的一个不同的实施方案是包括下述步骤的方法：

（1）使生物实体与含有酶分子的试验溶液接触，以使酶分子结合到靶分子上，并且

（2）使酶催化反应，

所说的试验溶液包含酶和选自下列一组的化合物：脂族烷烃、烯烃、环糊精、脂肪酸酯、酰胺或内酰胺，以及有机硅烷，

所说的酶选自DNA聚合酶、RNA聚合酶、反向转录酶、RNase H、DNA连接酶及RNA复制酶这一组酶。

所说的生物实体是细胞或病毒。

在另一个方案，本发明涉及信号增强剂修饰的方法，该方法包括以下步骤：

（1）使生物实体与含有探针分子的试验溶液接触，以使探针分子结合到靶分子上，

（2）从试验溶液中除去生物实体，

（3）将信号增强化合物加入了其中悬浮有生物实体的溶液中，

（4）检测由结合靶的探针分子直接或间接产生的作为信号的光量子。

所说的信号增强化合物选自醇、脂族烷烃、糖、脂肪酸酯、酰胺或内酰胺，以及有机硅烷这一类化合物。

由探针分子的荧光部分发射出的光量子被认为是由结合靶的探针分子直接产生的量子。作为裂解化学发光基团中报告基团（如异鲁米

诺)内化学键的结果而发射的光量子也被看作是由报告基团直接发射的光子。作为放射活性基团发射的放射能量的结果,而由闪烁液发射出的光量子被认为是由报告基团间接产生的光量子。

最好当进行信号检测时将信号增强剂加入到悬浮有细胞的溶液中(“检测溶液”),即在步骤(4)期间。

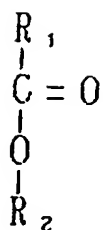
若将化合物加入检测溶液中,可大大增强最后观察到的信号这一事实表示所说的化合物即是信号增强剂。

在信号增强剂修饰方法的优选实施方案中,检测溶液包含一种或多种选自醇(2-20%)、脂族烷烃(2-20%)、烯烃(2-20%)、环糊精(2-20%)、式 $R_1(COO)R_2$ 的脂肪酸酯(2-20%)、式 $R_3(NH)(CO)R_4$ 的酰胺或内酰胺(2-15%)、和式 $R_5SiOSiR_6$ 的有机硅烷(2-20%)这一类化合物,且DMSO和选自该组的化合物合并体积不超过试验溶液30%(V/V)。

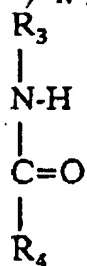
优选的化合物包括异三十烷、 β -环糊精、六甲基二硅氧烷、以及油醇、吡咯烷酮、异三十烷、特别是棕榈酸异丙酯、1,2-丙二醇和十二烷醇。使用这些优选化合物可使靶产生的信号对本底信号增加高达约3至4倍。较好的组合是约10%DMSO加约10%吡咯烷酮。另一较好的组合是约10%DMSO加5%异三十烷和5%吡咯烷酮。

符号的使用

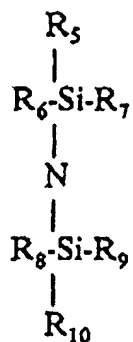
符号 $R_1(COO)R_2$ 代表有下列结构式的化合物:



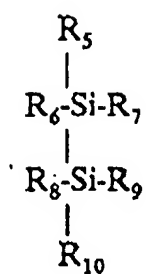
$R_3 (NH(CO)R_4)$ 代表有下列结构式的化合物：



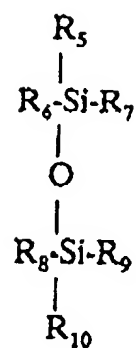
$(SiR_5R_6R_7)N(SiR_8R_9R_{10})$ 代表有下列结构式的化合物：



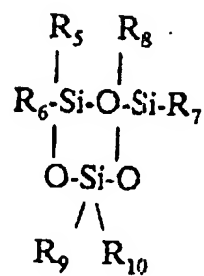
$(SiR_5R_6R_7)-(SiR_8R_9R_{10})$ 代表有下列结构式的化合物：



(SiR₅R₆R₇)O(SiR₈R₉R₁₀)代表有下列结构式的化合物：



(SiR₅R₆O)(SiR₇R₈O)(SiR₉R₁₀O)代表有下列结构式的化合物：



因此，例如根据本发明这一方面设计的药盒应包含探针分子和选自二甲基亚砷(DMSO)、醇、脂族烷烃、环糊精、脂肪酸酯、酰

胺或内酰胺以及有机硅烷的一组化合物。此外，例如另一药盒包含探针分子和含有一种或多种选自DMSO、醇、脂族烷烃、环糊精、脂肪酸酯、酰胺或内酰胺，以及有机硅烷的一组化合物的溶液，其中化合物的总体积不超过溶液的20% (V/V)。

在前述方法，溶液和药盒中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 具有链烷烃结构。

R_1 和 R_2 可共价结合形成环结构。

R_3 和 R_4 可共价结合形成环结构。

在前述方法中，在化合物后的括号中给出的百分数是以占试验溶液的百分比 (V/V) 表示的化合物的浓度。

进一步优选醇有2至40个碳原子；脂族烷烃有10至60个碳原子；烯烃有10至60个碳原子； R_1 和 R_2 加在一起有3至20个碳原子，若 R_1 和 R_2 不共价结合形成环，则 R_1 和 R_2 各有至少1个碳原子； R_3 加 R_4 有2至20个碳原子，若 R_3 和 R_4 不共价结合形成环，则 R_3 和 R_4 各有至少1个碳原子；以及 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 各有至少1个碳原子，这样六个烷基碳结构 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 一起共有不超过20个碳原子。

在更为优选的方法实施方案中，醇有3至30个碳原子，脂族烷烃有20至40个碳原子， R_1 加 R_2 一起有3至10个碳原子，且其中 R_1 和 R_2 不是共价结合成环时， R_1 和 R_2 各和至少3个碳原子；

R_3 和 R_4 加在一起有3至10个碳原子，其中 R_3 和 R_4 不是共价结合成环时， R_3 和 R_4 各有至少1个碳原子；而且 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 各有至少1个碳原子，六个烷基碳结构 R_5 、

R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 一起共有不超过 10 个碳原子。

用作通透增强剂的优选烯烃是其中碳-碳双键对碳-碳单键之比小于 1 比 3 的烯烃。最优选的比例是小于 1 : 10。

降低本底的化合物

总的方面，本发明涉及一种分析方法，即利用与生物实体（即细胞或病毒）结合之探针分子的数目作为该实体中靶分子数的度量，该方法包括下述步骤：

- (1) 将生物实体与溶液中荧光探针一起保温，
- (2) 从溶液中除去生物实体，
- (3) 使生物实体对荧光探针之吸收波长的光曝光并
- (4) 测量荧光探针发射波长处所发射的光量；

其中在完成步骤 (1) 之后和步骤 (4) 终止之前的时间，悬浮有生物实体的溶液中存在有降低本底化合物；

所说的降低本底化合物包括带有结构不同于荧光探针之荧光染料部分的光吸收部分；

所说的降低本底化合物具有的吸收波长范围（当进行检测时在该波长范围内它吸收光）包括荧光探针的发射波长范围（由探针发射的光的波长范围），于步骤 (4) 测量该波长范围的光量。

降低本底化合物最好是在步骤 (3) 和 (4) 中所用的悬浮有细胞（或病毒）的溶液内。为使光吸收化合物就一波长范围来说成为有效的本底降低剂，其在该范围的平均摩尔消光系数较好是在范围为 520 nm 至 560 nm 锥虫蓝的平均摩尔消光系数的至少 2%；更好是在该范围的摩尔消光系数相当于在 520 nm 至 560 nm 锥虫蓝之平均摩尔消光系数的至少 10%。

因为许多细胞荧光检测法是在可见光即约 400 nm 至 660 nm 范围内进行的，所以在该波长范围内有效的本底降低剂是特别有价值的。但有的细胞荧光检测并不需要在可见光范围内进行，因此在特定情况下也可使用在 250 至 1000 nm 范围内有吸收的本底降低剂。实际上本发明的原理可应用于能使用细胞荧光检测仪检测的任何波长。

本文中所说的“光”是指通过流动细胞计数器或使用荧光显微镜的观测器或照相机检测到的光。为此，在正常情况下应是可见光，但对于特殊检测来说，细胞计数器或显微镜改为检测能量大于或低于可见光的光子，为此目的该光子也被看作是“光”。

因为降低本底化合物的光吸收部分具有与荧光探针的荧光染料部分不同的结构，所以正常情况下应有所需特性，即如果它确实发射光（即它是一种荧光化合物），则将具有不同于荧光部分的发射光谱（即对于已被吸收的给定波长光的给定量而言，作为波长之函数，发射光的强度将有所不同）。

假定本发明实施方案特别有效是部分因为降低本底化合物结合到至少某些相同非特异性靶上（正如探针所结合的），并且因为降低本底化合物和探针是处于十分靠近的位置，故降低本底化合物将吸收由探针发射的光。此外，降低本底化合物将吸收由细胞内非探针分子的自发荧光发射的光。在吸收由非特异结合的探针或自发荧光分子发射的光之后，降低本底化合物可以其自身发射光波长发射光。而由特异性结合的探针分子发射的光由降低本底化合物吸收的程度较小，从而改善了该分析方法的总体敏感性。

最好在加入降低本底剂后的 4 5 分钟内检测荧光；但如果本底降

低剂是在步骤(3)和(4)中使用的溶液中,则可等到多至24小时进行荧光检测。

在本发明的一特别优选方案中,该方法还包括在上述步骤(2)和(3)之间加入洗涤步骤。可将细胞或病毒从悬浮它们的溶液中离心出来,然后将其再悬浮于洗涤溶液中,然后将细胞或病毒离心出洗涤溶液。洗涤溶液通常是无探针溶液,其中可以有也可没有降低本底化合物。

细胞应在含有降低本底化合物的无探针溶液中保留足够长时间,以使之吸收降低本底化合物。为此目的,一般是保持5分钟,但这一时间可以有很宽的变动范围。

探针将包含荧光染料。它也可包含共价结合到染料上的单股核酸(DNA或RNA)部分,部分(moiety)是分子的一部分。例如,由核酸贡献的探针部分称为核酸部分;由荧光染料贡献的部分称为荧光染料部分。可通过接头进行共价连接,其中染料和核酸分子(或抗体)在不同位点连接到接头分子上。

已公开了许多染料及其他光吸收化合物的最大发射和吸收波长数据(如参见Merck Index或Aldrich Chemical Company, Milwaukee Wisconsin的目录)。这些数据提示(但没有确定)什么化合物是适用的。扫描荧光仪将给出完整的发射或吸收光谱。下面列出了某些探针染料的一些降低本底化合物。就给定的探针染料来说,相对容易测试出来降低本底化合物的功效。

通常用作荧光探针染料的荧光素在大约488nm处有最大吸收波长,并在大约525nm处有最大发射波长。

可作为良好本底降低剂的吸收光化合物包括偶氮染料衍生物,其

具有多芳烃共轭部分，并且在该部分上有一个或多个极性基团如硝基（ $-\text{NO}_2$ ）、磺酰基（ $-\text{SO}_2$ ）或氨基（ $-\text{NH}_2$ ）。因为它们趋向结合到作为非特异结合探针的同一蛋白质和膜上。

许多探针染料中，适用于本发明的少数几个是荧光素、F I T C、德克萨斯红、香豆素、若丹明、藻红素和 Perci-P。

与探针染料荧光素（或荧光素异硫氰酸酯（F I T C））一起使用的某些降低本底化合物是偶氮胭脂红B、酸性红114、伊凡斯氏蓝、宫廷坚黑 Wan、锥虫蓝、萘酚蓝黑和硫代若丹明101（Sulforhodamine 101）。

与探针染料德克萨斯红合用的某些降低本底化合物是萘酚蓝黑和宫廷坚黑 W A N。对于荧光素以外的探针染料，有用的降低本底化合物可不同于与荧光素或 F I T C 标记的探针合用的降低本底化合物。在用荧光检测器，荧光显微镜或流动细胞计数器检测的探针染料的发射波长范围中，优选降低本底化合物具有的平均摩尔消光系数为在 520 nm 至 560 nm 范围内锥虫蓝的平均摩尔消光系数的至少 2%（更优选 10%）。

对于任何染料荧光探针来说，有许多化合物可用作本底降低剂。一般来说，所用本底降低剂的浓度可以在 0.0002% 和 0.10%（W/V）之间。

游离基清除剂作为本底降低剂

总的方面，本发明提供了能够检测生物实体（细胞或病毒）中或其上的靶分子的荧光检测法，该方法包括以下步骤：

（1）使生物实体与包含能够与所说生物实体内或其上的靶分子结合之荧光探针的溶液接触，所说的接触是以一种能使荧光探针与所

说的靶分子结合的方式完成的，从而使该探针成为结合生物实体的探针，

(2) 使生物实体与含有游离基清除剂的溶液接触，

(3) 使结合生物实体的探针吸收所说的结合生物实体之探针的荧光吸收波长的光，并

(4) 检测所说结合生物实体之探针的荧光发射波长的光；

其中步骤(1)是在步骤(2)之前，步骤(2)之后，或步骤(2)期间发生的。

如果荧光探针和游离基清除剂在同一溶液内，则认为步骤(1)和(2)是同时发生的。

较好通过在同一溶液中包含荧光探针和游离基清除剂来同时进行步骤(1)和(2)。

在步骤(4)期间，最好选择适当的游离基清除剂以适应使由清除剂发射之光的量不超过清除剂引起的自发荧光的降低量这一条件要求。可通过一次不加清除剂，一次加清除剂这样的两次检测过程(在两种情况下，可以检测中不用探针)来检测某清除剂对给定之荧光吸收和荧光发射波长并存条件是否适宜。

游离基清除剂包括下列四类化合物：

1) 氢供体化合物，较好是有硫羟基团特别是连接到芳香基团上之硫羟基团的化合物，如苯硫酚。

2) 不是氢供体但有能与其他游离基结合之游离基的化合物。例子包括N-羟基衍生物如染料 Tempo、肼衍生物和偶氮衍生物，该偶氮化合物中通过双键连接到另一氮原子上并通过单键连接到碳原子上的氮携带游离基。这些化合物最好有这样一种结构：它能造成空间位

阻，避免其相互反应，而省去不得不清除游离基的麻烦。

3) 对位羟基芳族化合物。维生素E (优选的清除剂) 是这一类化合物。

4) 有不饱和碳原子 (koelch 基团) 的化合物。

其他人已鉴定了许多包括上述多类化合物的游离基清除剂。

可根据其在规定条件下作为游离基清除剂的能力来定义游离基清除剂。如果FRS代表作为游离基清除剂的待试化合物，则可利用下列三步骤检测法证实FRS是游离基清除剂：

1) 在5 ml二甲基甲酰胺中混入FRS和10 mg三氯乙酰过氧化物，以使FRS对三氯乙酰过氧化物的摩尔比例为2:1。

2) 将反应混合物加热到80℃保持M分钟。

3) 用高效液相色谱 (HPLC) (如果 $C_{13}C-FRS$ 不是挥发性的) 或气相色谱 (如果 $C_{13}C-FRS$ 是挥发性的) 法分析反应混合物，检测 $C_{13}C-FRS$ 的量。根据所测得的 $C_{13}C-FRS$ 的量定义清除活性。

选择适当时间M分钟，以便若用该方法试验维生素E时，使转化成 $C_{13}C-$ 维生素E的维生素E的百分比例小于100。一般说来，预期M小于10分钟。

当在相同条件下试验两种化合物时，可经比较所形成的 $C_{13}C-FRS$ 量来计算这两种化合物 (如维生素E和另一种化合物) 的相对清除活性。如果某化合物所形成的 $C_{13}C-FRS$ 的量是当在检测中加入维生素E时所形成之量的20%，则该化合物清除活性为维生素E之清除活性的20%。

检测清除活性的方法是基于一系列反应，其中包含在80℃下处

理引起一分子三氯乙酰过氧化物分解，而产生两分子游离基， Cl_3C^* ，再与游离基清除剂反应以产生 Cl_3C-FRS 。

探针或化合物（如游离基清除剂）的荧光吸收波长，是可被探针或化合物吸收的辐射波长（特别是紫外线或可见光），且若被吸收，则可导致由该探针或化合物以长于荧光吸收波长的射线发射光（特别是可见光）。上述较长波长是指“荧光发射波长”。荧光吸收波长较好是在大约420nm至460nm范围内。荧光发射波长较好是在大约450nm至690nm范围内。在实践中，使探针群体于吸收波长范围暴光，并在发射波长范围内监测发射光。

荧光探针或化合物是具有荧光吸收波长和荧光发射波长的物质。

在本发明的荧光检测法中，较好选用游离基清除活性至少为维生素E之该活性的1%的游离基清除剂（每摩尔清除剂的清除活性），如果清除剂分子是其中多重复单元均有清除活性的聚合物，则重复单元的摩尔浓度可相应变化；更优选游离基清除活性至少为维生素E之活性的20%的清除剂，且最优选至少与维生素E有同样大清除活性的清除剂。

如将从实施例中看出的：一般该荧光检测法可基本上同时用于大量细胞。

在该方法的一个优选方案中，步骤（5）包括检测以大约520nm至560nm（特别是大约520nm）的波长发射的光，步骤（4）所测的吸收波长最好是小于520nm。

荧光检测法的优选实施方案还包括在步骤（2）和（3）之间的洗涤步骤。可将细胞从悬浮它们的溶液中离心出来，然后重新悬浮于洗涤溶液中，其后再从中离心出来以完成洗涤步骤。洗涤溶液通常是

无探针溶液。

游离基清除剂最好不是发射探针之荧光发射波长的光的荧光分子。具体地说，最好游离基清除剂既不吸收探针之荧光吸收波长的光，也不发射探针之荧光发射波长的光。

在该方法一特定方案中，步骤（2）中使用的溶液包含荧光探针、游离基清除剂和固定剂。为在混合物中加入游离基清除剂，其浓度较好是0.1%至10%（V/V）。

多标记报告物探针

在本发明的优选实施方案中，探针包括一单股核酸部分和多个报告物部分，以使多报告物部分借助接头部分共价连接到中间原子上，该中间原子连接到核酸部分的核苷酸原子上。核苷酸原子是位于在寡核苷酸之5'或3'端处，以相对的方向连接到仅一个核苷酸上的两个核苷酸之间的磷原子。报告物部分较好是染料分子；特别优选报告物部分为荧光染料部分。可用流动细胞计数器或在适于检测荧光的显微镜下检测荧光染料。

对于用来检测细胞核内靶分子（如核DNA）的探针上的染料来说，探针的长度较好是小于约40个核苷酸。如果探针有七个染料分子，多分子的分子量约为500和600之间，并且有七个分子量与乙酰氨基部分分子量（约为60）相近的接头部分和40个平均分子量约为345的核苷酸，则经标记之探针的分子量应为大约20,000。为了进行特异性杂交，一般探针长度应至少有大约15个碱基。

对于用来检测细胞胞浆内核酸特别是RNA的探针来说，较好选用长度不超过200个核苷酸（分子量不大于约100,000）的

探针，但也可以使用例如1000个核苷酸长的较大寡核苷酸。

对于染料来说，最接近接头的染料环至少要是由两个磷分隔开（即“分隔长度至少为两个原子”）。一般说来，分隔长度较好为3至30个原子，特别优选3到10个原子的分隔长度。

为了尽可能地减少潜在的抗杂交和骤冷影响，将结合染料之磷原子与寡核苷酸骨架上下一个结合染料的磷原子分开的平均核苷数优选至少为4个。各结合染料的磷原子更优选由至少6个将之与寡核苷酸上的下一个结合染料的磷原子分隔开。

介入接头部分和核苷内磷原子之间的原子例如可以是氧原子、硫原子或氮原子。若中间介入原子是氧原子，则有一个核苷间磷酸三酯键，若中间介入原子是硫原子，则有一个核苷间硫代磷酸三酯键，如果中间介入原子是氮原子，则有一个核苷酸间氨基磷酸三酯核苷间键（参见 Agrawal and Jamecnik, *Nucleic Acids Research*, Vol 18: 5419, 1990），例如硫代磷酸三酯和氨基磷酸三酯键。三酯键包括见于天然核酸骨架上的二酯键加上磷原子和中介原子（介入磷原子和接头部分之间的原子）之间的第三个酯键。

如果中介原子是硫原子，则接头部分可以是乙酰氨基部分。在此情况下，如果染料是荧光素，则分隔染料分子环和核苷间磷原子之原子的数目将是4（氮和乙酰氨基部分的两个碳原子加上中间介入的硫原子）。

如果中介原子是氮原子，则接头部分可以是氨基部分。在此情况下，如果染料是荧光素，则分隔最接近接头之染料分子环和核苷间磷原子之原子的数目将是8，即包括氮和6个接头部分的碳原子加上中间介入的氮原子。如果染料分子是异硫氰酸荧光素，则分隔最接近

接头之染料分子环和磷原子的原子将还包括另外两个原子，即由异硫氰酸酯部分贡献的氮和碳原子。

可以认为，因探针的核酸链与靶的核酸链杂交而形成杂交分子，是基于该两股链的核苷酸序列彼此互补（例如核苷的碱基腺嘌呤互补于另一核苷的尿嘧啶或胸腺嘧啶，鸟嘌呤互补于胞嘧啶）这一现象，然而，并不一定探针的整个核苷序列与靶的整个核苷序列互补。

可按需要选择荧光染料。常用的荧光染料（注意带有方便的接头部分）是5-（2-碘乙酰）氨基）乙基）氨基）萘-1-碘酸、5-碘乙酰氨基荧光素、6-碘乙酰氨基荧光素、四甲基若丹明-5-碘乙酰胺、四甲基若丹明-6-碘乙酰胺、一溴二亚胺、赤藓红-5-碘乙酰胺、7-二乙氨基-3-（（4'-碘乙酰氨基）苯基）-4-甲基香豆素、4'-（（碘乙酰氨基）甲基）荧光素、赤藓红-5-碘乙酰胺、生物素碘乙酰胺、N-（1-苊）碘乙酸酯、生物素碘乙酰胺、N-（1-苊）碘乙酸酯、N-（（2-（碘乙酰氨基）乙基）-N-甲基）氨基-7-硝基苯并-2-噁-1，3-二唑。

碘乙酰胺的许多可替代物之一是马来酰亚胺。

为本发明之目的，优选的染料是7-二乙氨基-3-（（4'-碘乙酰氨基）苯基）-4-甲基香豆素，特别是5-碘乙酰氨基荧光素、6-碘乙酰氨基荧光素、四甲基若丹明-5-碘乙酰胺、四甲基若丹明-6-碘乙酰胺和N-（（2-碘乙酰氧基）乙基）-N-甲基）氨基-7-硝基苯并-2-噁-1，3-二唑。

对于真核细胞的原位杂交来说，一溴二亚胺的效果较差，这可能是因为它不能有效地通过细胞膜。

重要的是，在杂交试验的条件下，报告物部分能稳定地连接到核

酸探针部分上，给出足够的信号，而且如果它是一种荧光染料，还具有便于利用的激发和发射波长。

在一个用于检测核DNA的30mer（即30个核苷酸长）的特定实施方案中，有四个核苷间磷原子连接到硫原子上，该硫原子则连于连有染料部份的接头部分上。这四个磷原子分别出现在核苷1和2，7和8、23和24及29和30之间（核苷计数是按照5'至3'方向进行的）。

在另一个用于检测胞浆RNA的39mer的特定优选实施方案中，也有四个核苷间磷原子连接到连于硫-接头-染料部份的硫原子上，这些磷原子分别出现于核苷1和2，9和10、30和31，以及38和39之间。

从上面提到的30mer和39mer序列中，可以看出，在探针的中部出现核苷伸展，从而没有与磷原子连接的硫原子。对于30mer来说，其中存在长度为16个核苷长的无硫区域。对于39mer来说，其中有一个21核苷长的无硫区域。之所以包括这些无硫区（并因此而没有硫-接头-染料），因为其存在不由硫-接头-染料复合体的影响而降低杂交能力的区域。

对于细胞特别是人细胞中的基因单一拷贝来说，可能有必要利用有大约800个不同30mer的探针群体；如果按照它们杂交的次序沿着单一靶分子端对端地排列起来，则将沿着把分子留下长

24,000个核苷的无缺口的序列。就本发明的探针和方法来说这样一种策略仍是合理的。例如，不一定按照因为它上面带有一个或多个连接到硫-染料复合体上的磷原子而使各探针分子的一部分不会杂交的理论去使用交迭探针（即一个探针的3'端序列完全相同于其他

探针的5'端序列)。

染料分子的分子量大多在400至700范围内。但也可使用较大如分子量700至1500的染料分子。

对于用来检测细胞核中靶分子(如核DNA)的探针上的染料来说,探针的长度最好小于约40个核苷酸。如果探针上有七个分子量各为约500至600的染料分子,和七个具有与乙酰氨基部分相似分子量(约为60)的接头部分和40个平均分子量约345的核苷酸,那么经标记探针的分子量应约为20,000。为发生特异性杂交,探针一般应为至少15个碱基长。

对于用来检测细胞胞浆中核酸特别是RNA的探针来说,其长度不大于200个核苷酸(分子量不大于约100,000)较好,但也可使用更大些的如1000个核苷酸的寡核苷酸。

如果期望在荧光素和与磷连接的硫之间只有两个原子,可以购买市售化合物和5-溴甲基荧光素。可使染料环和磷原子间隔有5至20个原子的接头是:1-苾甲基碘乙酸酯(4原子接头,不包括介入接头和核苷间磷原子间的硫原子),N-(2-(碘乙酰氧基)乙基-N-甲基)氨基-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑(6原子接头)和5-(2-(2-(碘乙酰)氨基)乙基)萘-1-磺酸(6原子接头),以及6-(6-(2-(碘乙酰)氨基)己酰)氨基)己酸琥珀酰亚胺酯(16原子接头)。在使用化合物6-(6-(2-(碘乙酰)氨基)己酰)氨基)己酸琥珀酰亚胺酯时,首先通过其NH₂基团将染料分子(例如其有6个以上原子贡献于接头的染料)连接到该化合物上,然后使该产物与硫化的核酸部分反应。

总地来说,本发明涉及能够检测生物实体(细菌或病毒)中或其

上的靶分子的检测方法或者说分析方法，该方法包括以下步骤：

(1) 使生物实体与含有能够与所说的生物实体中或其上之靶分子结合的探针的溶液接触，所说的接触是以一种使探针与所说的靶分子结合，从而使该探针成为结合生物实体的探针的方式进行的，所说的探针含有报告物基团，

(2) 使生物实体与含有芳族报告物基团之结构类似物的溶液接触，

(3) 进行只检测与生物实体结合之探针上的报告物基团，但不检测与生物实体结合之类似物的一个或多个步骤，

其中步骤(1)是在步骤(2)之前，步骤(2)之后或步骤(2)期间发生的，

如果探针和类似物是在同一溶液中，则步骤(1)和(2)被认为是同时发生的。

最好在同一溶液中加入探针和类似物，以同时完成步骤(1)和(2)。

步骤(3)是以一种检测报告物基团但不检测类似物的方式进行的(如对于荧光探针，使用能导致检测报告物基团但不检测类似物的激发和/或发射波长)。

本发明的一个次要方面，报告物基团是环状化合物。本发明的另一个次要方面，环状基团包括有不饱和键。本发明的一个较窄的次要方面，环状基团是芳族化合物(一个或多个苯环)。

以摩尔计类似物超过报告物基团的量较好；更优选类似物相当于报告物基团的至少10倍。

可以假定本发明的方法是基于类似物与报告物基团竞争非特异性

结合位点。在使用金精或其衍生物与核酸探针结合时，另一个机制可能包括金精结合到蛋白质中本应结合报告物基团的活性位点上。

选择适当的类似物，以使之保留大多数或所有报告物基团的结构特征。类似物可以具有探针所没有的其他结构特征。

类似物应能够穿透细胞或病毒。在类似物是金精衍生物（玫红酸衍生物）的情况下，优选类似物在芳族基团上带有 $-CO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 或 $-SO_3$ 基极性功能团；其例子是铬精花青 R

（chromoxane cyanine R）和铬天青 S。优选类似物的亚基团是封闭赖氨酸上 NH_2 基团的亚基团。使报告物基团吸收能量，然后发射某些吸收的能量，检测所发射的能量，从而得以检测荧光报告物基团。

使化学发光报告物基团进入反应如酶促反应中导致能量以光的形式发射出来，从而得以检测化学发光报告物基团。

其他报告物基团如生物素，因为它们能与直接或间接结合到酶（如能催化可检测之反应的碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶）上的链霉抗生物素蛋白之类结合而得以被检测。

本发明可使用的荧光基团包括荧光素（或 FITC）、德克萨斯红、香豆素、若丹明、若丹明衍生物、藻红素和 Perci - P。

本发明可使用的化学发光基团包括异鲁米诺（或 4 - 氨基邻苯二甲酰肼；参见 Aldrich Chemical Co.，1990 - 91 目录，或参见 Molecular Probes Inc. 目录）。

下列化合物是羧四甲基若丹明 5 - 和 6 - 琥珀酰亚胺酯（激发波长（ex）：550 nm；发射波长（em）：576 nm）的类似物：

1) 5 - 和 6 - 羧基 - X - 若丹明（ex：576 nm，em：597 nm）；

- 2) 咕吨-9-羧酸;
- 3) 均质兰A钠盐 (ex: 596 nm; em: 724 nm);
- 4) 劳氏紫 (ex: 598 nm);
- 5) 曙红-5-异硫氰酸酯 (ex: 522 nm, em: 543 nm);
- 6) α -铁杉内酯 (Tougalactone);
- 7) Eluetherin; 和
- 8) 荧光素 (2 (3, 6-二羟咕吨基) 苯甲酸)。

下列化合物是7-二乙氨基香豆素-3-羧酸琥珀酰亚胺酯
(ex: 432 nm, em: 472 nm) 的类似物:

- 1) 7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸琥珀酰亚胺酯
(ex: 351 nm, em: 441 / nm);
- 2) 1, 2, 3, 4-四氢-1-萘胺 HCl;
- 3) 1, 2-二羟萘;
- 4) 4, 8-二羟喹啉-2-羧酸, 和
- 5) 1, 5-二羟-1, 2, 3, 4-四氢萘。

下列化合物是异鲁米诺 (4-氨基邻苯二甲酰肼) 的类似物:

- 1) 1, 4, 5, 8-萘四羧酸;
- 2) 羟吡啶;
- 3) 1, 2, 3, 4-四氢- β 萘酸, 和
- 4) 1, 3-萘二磺酸-7-羟。

下列蛋白质是碱性磷酸酶 (牛小肠, 39 KD) 的类似物:

- 1) 过氧化氢酶, 57.5 KD;
- 2) 卵白蛋白, 45 KD;
- 3) 醛缩酶, 40 KD; 和

4) β -半乳糖苷酶, 116KD。

在本方法的一个优选方案中, 当报告物基团是荧光素时, 步骤(4)包括检测波长在大约520nm和560nm之间(特别是约520nm)的发射光, 步骤(3)的吸收波长最好是小于520nm。

荧光检测法的优选方案进一步包括步骤(2)和(3)之间的洗涤步骤。洗涤步骤可按如下进行, 从悬浮有细胞的溶液中将细胞离心出来, 然后将其悬浮在洗涤溶液中, 并从洗涤溶液中离心出细胞。洗涤溶液通常是无探针溶液。

在本方法的特定方案中, 步骤(2)中使用的溶液包含探针(包括报告物基团)、报告物基团的类似物, 以及固定剂。这样的探针溶液本身也构成本发明的一部分。

如果在步骤(2)所用溶液中加入类似物, 则其浓度较好为0.01至0.5%(特别是大约0.05至0.01%)(W/V)

优选组合方式是荧光素或若丹明衍生物与金精, 其衍生物或Napachrome Green 合用。

探针

核酸探针可以是DNA、RNA或包括DNA或RNA的寡核苷酸或多核苷酸。DNA或RNA可含碱基腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶或其任何天然或人造化学衍生物。探针能够通过一种或多种类型的化学键, 通常是通过形成氢键结合到互补或镜像靶细胞基因序列上。

在加入到杂交溶液之前, 可对核酸探针进行可检测性标记。另外可检测标记可挑选能结合到杂交产物上者, 可用任何可检测基团标记探针, 而实际用于本发明中这样的可检测基团可以是任何有可检测

之物理或化学特性的材料。特别有用的是酶促活性基团，如酶（参见 Clin Chem., 22: 1243, 1976），酶底物（参见英国专利说明书 1,548,741），合酶（参见美国专利 No. 4,230,797 和 4,238,565）和酶抑制物（参见美国专利 No. 4,134,792），荧光物质（参见 Clin Chem., 25: 353, 1979），发色团、发光物质如化学发光物质和生物发光物质（参见 Clin Chem., 25: 512, 1979），特别是可结合的配基，近端相互作用以及放射性同位素如 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、和 ^{14}C 。

可借助缺口翻译，酶学或化学方法将生物素标记的核苷酸掺入到 DNA 或 RNA 中。使用抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白、荧光、酶或胶体金结合物杂交后检测生物素化的探针。也可以使用其他荧光化合物，可进行免疫检测的荧光衍生物或生物素类似物标记核酸。也可借助与蛋白质连接来标记核酸。也可使用与放射活性物质或荧光组蛋白 H1、酶（碱性磷酸酶和过氧化物酶）或单链结合（ssB）蛋白质交联的核酸。为了增加检测胶体金或过氧化物酶产物的敏感性，可采用多种使用银溶液进行的增强或放大方法。

也可使用间接荧光免疫细胞化学方法（Rudkin and Stollar, 1977, Nature 265: 472, Van Prooijen et al., Exp. Cell Res., 141: 397, 1982）。经给动物注射 poly(rA) - poly(dT) 而产生抗 RNA - DNA 杂交体的多克隆抗体。使 DNA 探针与细胞原位杂交，并在与抗 RNA - DNA 杂交体之抗体一起保温后检测杂交体。发光生物素TM（PhotobiotinTM）标记探针优于生物素标记探针。

细胞、组织和体液中的靶

分析物RNA可定位于细胞或病毒生物实体中。可将细胞或病毒悬浮于溶液中而不固定在固相载体上。另一方面，也可将细胞或病毒固定在固相载体上。细胞或病毒可以是组织切片的一部分。

在本方法的一个实施方案中，在杂交期间将靶细胞固定在固相表面上。在另一方案中，靶细胞在整个操作过程中均悬浮于液体内而不固定在固相表面上。本发明中特别适于使用常规流动细胞计数装置。

含有分析物核酸分子的细胞可以是真核细胞（如人细胞）、原核细胞（如细菌）、植物细胞或其他类型细胞。它们可以是简单的真核细胞如酵母，或者是由复杂真核生物如人体得到的细胞。

分析物RNA可以是无被膜或有被膜（具有非包裹膜如脂蛋白膜）的病毒。

分析物RNA可以是病毒RNA。对于某些病毒（如人免疫缺陷病毒）来说，在单一细胞内可同时存在互补的分析物RNA链。

病毒核酸靶可以是病毒的一部分，此时病毒可以在或不在细胞内。另外，病毒核酸靶也可能不是病毒的一部分，但可能是在细胞内。

可对存在于液态悬浮液、波片上或其他固相载体上的细胞内、组织培养细胞内及组织切片中之生物实体内的靶进行杂交分析。当生物实体是细胞时，其可来自实体组织（如神经、肌肉、心脏、皮肤、肺、肾、胰、脾、淋巴结、睾丸、子宫颈和脑），或者是存在于各种衬膜通道、导管和腔体（如胃肠道、尿道、输精管、子宫腔、子宫管、阴道、呼吸道、鼻腔、口腔、咽喉、气管、支气管和肺）或体液（如尿、胃液、脊髓液、血液和淋巴液）或粪便中的细胞。

杂交固定剂和溶液

已在PCT申请WO 90/02173和WO 90/02204中讨论了固定化细胞的固定剂和杂交方法。固定剂应能很好地保持细胞的形态学，及杂交靶的可接近性和杂交能力（必要时还应保持抗原的可接近性和免疫反应性）。沉淀固定剂包括乙醇、乙酸、甲醇、丙酮和这些物质的组合。交联固定剂包括多聚甲醛、戊二醛和甲醛。必须在不致于形成俘陷核酸的网络或对其造成共价修饰从而破坏其可杂交性的条件下使用交联固定剂。

固定剂可选自由单独或联合使用的任何沉淀剂或交联剂组成的一类物质，并可以是含水或不含水的。固定剂可选自甲醛溶液、醇、盐溶液、氯化汞、氯化钠、硫酸钠、重铬酸钾、磷酸钾、溴化铵、氯化钙、乙酸钠、氯化锂、乙酸铯、乙酸钙或镁、硝酸钾、重铬酸钾、铬酸钠、碘化钾、碘酸钠、硫代硫酸钠、苦味酸、乙酸、多聚甲醛、氢氧化钠、丙酮、氯仿、甘油、百里酚等组成的一类物质。固定剂最好包含通过沉淀作用固定细胞成分并具有下列特征的试剂：使用是可逆的，可保持细胞（或病毒）形态、保留所需细胞成分的抗原性、使核酸在细胞中保留适当的定位、不会以一种使核酸不能形成双或三股杂交体的方式修饰之，以及不以一种使核酸与所有已存在的靶序列杂交受到抑制的方式影响细胞成分。

所使用的交联剂最好小于10%（V/V）。用于检测分析物核酸分子之方法的步骤2中的杂交溶液一般可含有高离液序列变性剂、缓冲液、微孔形成剂、杂交体稳定剂。高离液序列变性剂（Robinson, D. W. and Grant, M. E. (1966), J. Biol. Chem. 241: 4030; Hamaguchi, K. and Geiduscheck, E.

P. (1962), J. Am. Chem. Soc. 84:1329) 包括甲酰胺、尿素、硫氰酸、胍、三氟乙酸盐、四甲胺、高氯酸盐和碘化钠。可优选任何能使PH保持在至少7.0至8.0之间的缓冲液。微孔形成剂可以是去污剂如 Brij 35、Brij 58、十二烷基硫酸钠、CHAPS或 Triton X-100之类。0.05% Brij 35或0.1% Triton X-100看来可使探针通过胞浆膜但不通过核膜。而脱氧胆酸钠将使探针穿过核膜，因此为了限制与胞浆生物多聚物靶杂交，应避免使用核膜微孔形成剂。当靶生物多聚物定位于胞浆内时，这种选择性亚细胞定位通过降低或防止探针与互补核序列杂交从而提高该方法的特异性和敏感性。杂交体稳定剂如一或二价阳离子盐包含于杂交溶液中，用于促进探针之互补序列与其靶生物多聚物之间的氢键的形成。氯化钠浓度最好是0.15M至1M。为了防止核酸探针的非特异性结合，可在杂交溶液中加入与靶生物多聚物无关的核酸。

可利用的固相载体包括(但不限于)玻璃、Scotch条(3M)、尼龙、Gene Screen Plus (New England Nuclear)和硝酸纤维素。最好使用显微镜载玻片。

为了构成用于完成本发明各种方法的药盒，可将用于本发明的各种化合物和试剂放入包和/或瓶内。并装进单一容器中并最好附有如何完成本发明方法的说明书。

其中应包括用于杂交的试剂，如含甲酰胺的缓冲液。杂交试剂最好包括下述一种或多种：本发明的通透增强剂、游离基清除剂及报告物基团类似物。较好的药盒应带有本底降低剂，如荧光检测期间使用的伊凡斯氏蓝。药盒的另一实例方案则包括信号增强剂。特定的药盒

应含有用于特定诊断目的如诊断病毒RNA感染的探针。

试剂

可从多种不同来源购买试剂, 包括 Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri; Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon; Clontech, Palo Alto, California; Kodak, Rochester, NY 和 Spectrum Chemical Manufacturing Corp., Gardeneia, California。

在本文中某些物质的其他信息可见下示表1。

表1. 化合物和染料的缩写和通用名称

缩写或 通用名称	化合物
Tempo	2, 2, 6, 6 - 四甲基哌啶 - N - 氧基 (CAS # 2564 - 83 - 2)
EDTA	乙二胺四乙酸
DMSO	二甲基亚砷
DTT	二硫苏糖醇
PVP	聚乙烯吡咯烷酮
PEG 4000	聚乙二醇 (分子量约 4000)
PBS	磷酸盐缓冲盐水溶液
CHAPS	3 - ((3 - 胆酰氨基丙基) - 二甲基氨) - 1 - 丙烷 - 磺酸盐 (CAS # 75621 - 03 - 3)

发光生物素	N - (4 - 叠氮基 - 2 - 硝基苯基) N' - (3 - 生物素基氮丙基) - N' - 甲基 - 1, 3 - 丙二胺 (C A S # 9 6 0 8 7 - 3 7 - 5)
Ficoll	非离子聚蔗糖 (Pharmacia)
Percoll	胶体 P V P 涂覆的硅 (C A S # 6 5 4 5 5 - 5 2 - 9)
Triton X-100	辛苯氧基聚乙二醇 (一种聚氧乙烯醚) (C A S # 9 0 0 2 - 9 3 - 1 ; 参见 Aldrich Chem . Co . 1 9 9 0 - 9 1 目录)
Brij 3 5	聚氧乙烯 2 3 十二基醚 (C A S # 9 0 0 2 - 9 2 - 0)
Brij 5 8	聚氧乙烯 2 0 十六基醚 (C A S # 9 0 0 4 - 9 5 - 9)
Hoechst33258	2' - [4 - 羟苯基] - 5 - [4 - 甲基 - 1 - 嘧啶基] - 2 , 5' - 双 - 1 H - 苯甲酰氨吡 咯三盐酸化物 (C A S # 2 3 4 9 1 - 5 2 - 3)

染料缩写

染料编号	染料实际名称	缩写
1 2	苯酚蓝黑	苯酚 B 1 . B 1 K .
1 3	宫殿坚牢黑 W A N	宫殿 F - B W A N
2 0	磺基若丹明 101 水合物	磺基若丹明 1 0 1
	异硫氰酸酯荧光素	F 1 T C

溶液

SSC 具有下列组成：0.15 M NaCl、0.15 M 柠檬酸钠，PH 7.0。配成 X SSC 以便在用水 1:1 稀释后将得到 SSC；配成 10 X SSC，以便在用水 1:10 稀释后得到 SSC。0.1 X SSC。0.1 X SSC 是用水以 1:10 稀释 SSC 得到的。

流动细胞计数中使用的固定溶液 F 含有下列成分：4 体积 (vol) 乙醇加 5 体积 1 X PBS 溶液加 1 体积冰醋酸。

1 号洗涤溶液 (#1) 具有下列组成：0.4 M 异硫氰酸酞，0.1% Triton X-100，0.1 X SSC，溶于去离子水。2 号洗涤溶液 (#2) 具有下列组成：0.1% Triton X-100，0.1% SSC，溶于去离子水。

PBS 是磷酸盐缓冲盐水，配方为 0.136 M NaCl，0.003 M KCl，0.008 M Na₂HPO₄ · 7H₂O，0.001 M KH₂PO₄。

实施例 1

使用针对含互补核酸链之靶的交迭探针

a) 使具有附加染色体 18 (XX=18) 的细胞系生长为会合的单层, 然后用胰蛋白酶消化。并用细胞旋转 (cytospin) 法将大约 5,000 个细胞沉积在干净的玻片上。

交迭序列 (H18-100L, H18-100R 和 H18-110R 分别在一个链上的 213、238 和 263 位有其 5' 末端; H18-11 和 18-10 分别在另一条链的 275 和 250 位上有其 5' 末端) 来源于已公开发表的染色体 18 上的 α 着丝粒重复 DNA 序列。序列如下:

Probe Designation	Sequence (5' to 3')
H18-10	TCTTAGTGTGAGTACACACATCTCA
H18-11	CTCCTTCAAAACGGTGGTTCAATTC
H18-100L	CTCAGAACTTATTTGAGATGTGTGT
H18-100R	ACTCACACTAAGAGAATTGTTCCAC
H18-110R	CGTTTTGAAGGAGCAGTTTTGAAAC

合成 (Applied Biosystems DNA 合成仪, 380B 型, A.B.I. 试剂) 寡脱氧核苷酸, 并在最后阶段将氨基接头加到 5' 末端磷酸上。然后将寡脱氧核苷酸上的接头偶联到若丹明染料 (从 Clontech 购得) 上, 并使用基线 810 色谱工作装置以

Waters HPLC 纯化之。

为完成杂交步骤，将 20-25 μ l 由 30% 甲酰胺、5X SSC、0.1 M 磷酸钠缓冲液 (PH 7.4)、100 μ g/ml 低分子量变性的鲑鱼或鲱鱼精子 DNA、5% (V/V) Triton X-100、5X Ficoll/PVP, 0.4 M 异硫氰酸胍、10 mM DTT 和 0.025 M EDTA, 以及以 2.5 μ g/ml 浓度加入的探针组成的杂交混合物加入沉积于玻片上的细胞中。将玻片放入孵箱中于 85 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟，而同时进行变性和杂交。

杂交后，在由 0.1X SSC 和 0.4 M 异硫氰酸胍及 0.1% Triton X-100 组成的溶液中，于搅拌下将玻片洗 2 分钟。然后再在含有 0.1X SSC 和 0.1% Triton X-100 的溶液中搅拌下洗 5 分钟，洗完后从溶液中除去细胞。然后加入 15 μ l 含有 0.1% 1,4-苯二胺抗衰剂（在 50% 甘油中）和 1 μ g/ml Hoechst (33258) 的固定溶液。

使用 Kodak Ektachrome EES-135 (PS 800/1600) 胶片，在具荧光分辨能力的 Olympus BH10 显微镜上进行显微照相，曝光和在 1600 ASA 处进行扩充加工。曝光时间为 20 秒。

肉眼观察玻片发现，用所有探针得到的信号强度是单用有意义链或单用反义链所得强度的两倍。

(b) 使用 CCL 1550 "CAski" 细胞。它们是含有已整合到其基因组中之 400-500 个 HPV 16 拷贝的人颈部肉瘤细胞系 (Science 196:1456-1458, 1977)。使用得自颈部癌活检组织且不含人乳头瘤病毒的人颈部肉瘤衍生细胞

系 H T B 3 1 “ C - 3 3 A ” (J . Natl. Cancer Institute
3 2 : 1 3 5 - 1 4 8 , 1 9 6 4) 作为对照。

探针群体由 2 3 个探针组成: 1 2 个编号为 H P V 1 6 - 5 0 1
至 H P V 1 6 - 5 1 2 , 并在基因图上连续沿着 H P V 靶 D N A 的一
条链 (1 号链) 上的 3 0 0 碱基区域排列的探针, 加上 1 1 个连续编
号为 H P V 1 6 - 4 2 6 到 H P V 1 6 - 4 3 6 , 并在基因图上连续
沿着 2 号链 (即 3 0 0 碱基序列的互补链) 的 2 7 5 碱基区域排列的
探针。当有交迭时, 则一条链上的探针和另一条链上的探针之间的
1 2 或 1 3 碱基交迭。这些序列是根据已公开的 H P V 1 6 型的序列
获得, 并通过 Genetic Sequence Data Bank, GenBank, version
6 9 . 0 选取的。这些探针的碱基序列 (从 5 ' 至 3 ' 方向) 如下:

HPV 16-501: AACTAGTAGCACACCCATAC CAGGG
HPV 16-502: TCTCGCCCAAGTGCCACGCCT AGGAT
HPV 16-503: TATATAGTCGCACAACACAA CACGT
HPV 16-504: TAAAGTTGTAGACCCTGCTT TTGTA
HPV 16-505: ACCACTCCCACTAAACTTAT TACAT
HPV 16-506: ATGATAATCCTGCATATGAA GGTAT

HPV 16-507: AGATGTGGATAATACATTAT ATTTT
HPV 16-508: TCTAGTAATGATAATAGTA TAATA
HPV 16-509: TAGCTCCAGATCCTGACTTT TTGGA
HPV 16-510: TATAGTTGCTTTACATAGGC CAGCA
HPV 16-511: TTAACCTCTAGGCGTACTGG CATT
HPV 16-512: GGTACAGTAGAATTGGTAAT AAACA

HPV 16-426: CACTGGGCGAGACCCTGGTA TGGGT
HPV 16-427: TGCGACTATATAATCCTAGG CGTGC

HPV 16-428: TCTACAACTTTAACCTGTTG TGTTG
HPV 16-429: AGTGGGAGTGGTTACAAAAG CAGGG
HPV 16-430: CAGGATTATCATATGTAATA TITGA
HPV 16-431: TTATCCACATCTATACCTTC ATATG

HPV 16-432: ATCATTACTAGAAAAATATA ATGTA
HPV 16-433: GATCTGGAGCTATATTAATA CTATT
HPV 16-434: AAAGCAACTATATCCAAAAA GTCAG
HPV 16-435: CCTAGAGGTTAATGCTGGCC TATGT
HPV 16-436: TTCTACTGTACCTAATGCCA GTACG

合成寡脱氧核苷酸，并在最后阶段将氨己基接头连接到5'末端磷酸上。然后使5'-氨己基寡脱氧核苷酸偶联到若丹明染料（得自Clontech）上并用HPLC纯化之。

为进行杂交，将20 μ l由PEG（21%），甲酰胺25%），5 \times SSC、蛙鱼精子DNA（1mg/ml）、Ficoll/PVP（15 \times ）、异硫氰酸胍（0.4M）、DTT（50mM）、Triton X-100（5%）、EDTA（50mM）、Na₂PO₄（50mM）和浓度为0.06% μ g/ml的探针组成的杂交混合物加到玻片上。放上盖玻片并将玻片于95℃加热5分钟，冷却到42℃后于该温度下保温25分钟。

杂交后，将玻片放在加有100ml含0.1 \times SSC、0.4M异硫氰酸胍和0.1% Triton X-100之洗涤溶液的科普林缸中。搅拌溶液并将溶液放置2分钟。去掉该溶液后换成由0.1 \times SSC和0.1% Triton \times 100组成的第二种洗涤溶液。将该溶

液搅拌1分钟后倾去，最后的洗涤步骤重复两次。洗涤后加入8 μ l 抗衰剂 / Hoechst 复染剂。用盖玻片盖上玻片并在荧光显微镜下观察。

使用 Kodak Ektachrome E E S - 135 (P S 800 / 1600) 胶片，在带有荧光分辨能力的 Olympus B H 10 显微镜上曝光摄取显微照片，并于7600 ASA 扩充加工。曝光时间为20秒钟。

表D所示结果表明，当使用1号链或2号链的12个寡聚体时，所得信号强度是在杂交溶液中使用两条链的探针所得强度的二分之一。

表 D

细胞	探针	标记	探针编号	结果(强度)
C-33A	2号链	FITC	1 1	-
Caski	2号链	FITC	1 1	++
C-33A	1号链	FITC	1 2	-
Caski	1号链	FITC	1 2	++
C-33A	1和2号链	FITC	2 3	-
Caski	1和2号链	FITC	2 3	++++

(c) 该实施例证明了本发明的几个方面，包括如何同时定量个

别细胞如HIV感染的细胞内的DNA和RNA。

使用H9细胞系。将细胞悬浮在40%乙醇、50%PBS和10%冰醋酸中并于4℃下放置12至16小时。固定后，离心除去固定液，用1×PBS洗1次并再悬浮在2×SSC中。细胞应立即使用。

用全探针的HIV序列是通过GenBank, version 69.0选取的，将它们切成如图2所示的30mer以制成HPV序列的探针。该设计导致一个15碱基的“交迭”区域。

探针命名	GenBank位置名称	荧光标记	分子探针，公司目录编号
HIV-有意义链	HUMHB102	FITC	1-3
HIV-反义链	HUMHB102	若丹明衍生物	T-488

制成一系列硫代磷酸酯寡核苷酸探针，各30-mer有4个硫原子。硫原子的定位如下：1个在探针的5'末端，第2个在第7和第8位核苷酸（从5'端计数）之间，第3个在第22和第23位核苷酸之间，第4个在第29和第30位核苷酸之间。然后按下述方法将多聚硫化寡核苷酸的硫原子偶联到荧光染料，如碘乙酰氨基-荧光素上（可调整体积来合成较小量产物）：将200μg干燥的寡核苷酸溶于100μl 250mM Tris缓冲液（PH7.4）中得到第一溶液。然后将1mg碘乙酰氨基荧光素与100μl无水二甲基甲酰胺（即100%DMF）合并成第二溶液。将两溶液混合在一起并振荡

过夜。过夜保温后，用乙醇和 3 M 乙酸钠沉淀标记的寡核苷酸。然后使此粗材料过 PD-10 柱以除去游离染料。于真空下除去含所需部分的液相并用 HPLC (高效液相色谱) 纯化所得材料。

为了进行杂交，将 50 μ l 含有 30% 甲酰胺、5 \times SSC、0.16 M 磷酸钠缓冲液 (PH 7.4)、1 μ g/ μ l 剪切的 DNA、3% (V/V) Triton X-100、5% FEG 4000、25 mM DTT、4 M 异硫氰酸胍、15 \times Ficoll/PVP 和以 2.5 μ g/ μ l 浓度加入的探针的杂交混合物加到离心收集的细胞上。于 42 $^{\circ}$ C 杂交 30 分钟。

杂交后，于 42 $^{\circ}$ C 下在搅拌的 1 \times SSC、4 M 异硫氰酸胍和 .1% Triton 中将细胞洗 5 分钟。然后，再在搅拌的 .1 \times SSC、.1% Triton 中于 42 $^{\circ}$ C 洗 5 分钟，此时，细胞为单细胞悬液。离心从洗涤溶液中分离出细胞并重新悬浮于 0.2 ml 由 0.0025% 伊凡斯氏兰 (在 1 \times PBS 中) 组成的复染溶液中。

用 Beckon Dickinson 制造的 FACSTARTM 分析细胞。该装置使用一个偶联到染料头上的 5 瓦氩激光，使用针对 FL1 的 525 nm 带通过滤光片，以及针对若丹明的 584 nm 带通过滤光片。对于各个被分析样品，均首先分析含阴性探针的样品并定在四分状态，以使不到 0.01% 的细胞落入右上四分之一或右下四分之一处。然后在分析上述样品的完全相同参数下分析以 HIV 探针进行分析的样品。因为四分状态是准确定好的，而且两样已作了完全相同的处理，所以在右上四分之一记录的细胞数目 (约 0.01%) 作为两条链和 / 或 mRNA 的阳性记录。在右下四分之一记录的细胞数目 (0.01% 以上) 则只是作为 DNA 的阳性记录。

实施例 2

本实施例证明在本例的杂交条件下 25 碱基寡聚体能够杂交，而 6 至 12 碱基寡聚体不能杂交。

下述实验中使用 H9 细胞系。用无核酸酶磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗培养的细胞，并以得到清楚分离之细胞的浓度制成单细胞悬液。离心沉淀细胞成团块并弃去上清液。将细胞重悬于 40% 乙醇、50% PBS 和 10% 冰醋酸中，并于 4℃ 下放置 12-16 小时。固定后，离心细胞以除去固定液，然后在 1×PBS 中洗 1 次并重悬在 2×SSC 中。细胞应立即使用。

设计定名为 28S-25-AL 的真核 28S rRNA 的保守片段并将其用作本文所述实验中的阳性对照探针。

从见于细菌中并且已知不与真核细胞内的核酸杂交的氮还原酶基因得到称为 NR25-AL 的阴性探针。下列表 4 中示出这两个探针的 DNA 序列。还用表 4 中所示序列制备衍生于这些 25 碱基寡聚体的 12 碱基、10 碱基、8 碱基和 6 碱基寡聚体。实施例中展示的所有序列均具有作为序列之左侧端的 5' 末端。

表 4

<u>Probe</u>	<u>Sequence</u>
28S-25-AL	ATCAGAGTAGTGGTATTTACCGGC
28S-21-AL	ATCAGAGTAGTGGTATTTAC
28S-18-AL	ATCAGAGTAGTGGTATTT
28S-15-AL	ATCAGAGTAGTGGTA
28S-12-AL	ATCAGAGTAGTG
28S-10-AL	ATCAGAGTAG
28S-8-AL	ATCAGAGT
28S-6-AL	ATCAGA
NR 25-AL	TACGCTCGATCCAGCTATCAGCCGT
NR 12-AL	TACGCTCGATCC
NR 10-AL	TACGCTCGAT
NR 8-AL	TACGCTCG
NR 6-AL	TACGCT

(本文描述的所有序列都是 5' 末端在左边)

合成寡脱氧核苷酸 (Applied Biosystems DNA 合成仪, 380B 型, 使用推荐的 A、B、I、试剂), 并在最后阶段将氨基己基接头接到 5' 末端磷酸上。纯化 5' - 氨基己基寡脱氧核苷酸, 将其偶联到得自 Molecular Probes 的若丹明衍生物上并使用基线 810 色谱工作状态以 Waters HPLC 纯化之。

为了进行杂交, 将由 30% 甲酰胺, 5 × SSC、0.16 M 磷

酸钠缓冲液 (PH 7.4)、 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 剪切的DNA、3% (V/V) Triton X-100 (聚氧乙烯醚的醇衍生物, 参见 Aldrich Chemical Co. 的 1990-91 目录)、5% PEG 4000 (聚乙二醇)、25 mM DTT (二硫苏糖醇)、0.4 M 异硫氰酸胍、 $15\times$ Ficoll/PVP 和以 $2.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度加入的探针组成的杂交混合物 $50\text{ }\mu\text{l}$ 加到细胞沉淀饼上。杂交于 42°C 下进行 30 分钟。上面所说的 $500\times$ Ficoll/PVP 是 5 g Ficoll 400 型 (分子量为 400,000 的聚蔗糖) 加 5 g PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 溶解于水中到终体积为 100 ml ; $15\times$ Ficoll/PVP 是用水以 $15/500$ 稀释比例稀释的 $500\times$ Ficoll/PVP。

杂交反应后, 适当的洗涤对消除因探针的非特异性结合造成的本底污染是十分必要的。杂交后将细胞放在已加有 10 ml 预加热至 42°C 、由 $0.1\times$ SSC、0.4 M 异硫氰酸胍和 0.1% Triton 组成之洗涤溶液的 15 ml 锥形试管内。搅拌溶液直到细胞成为单细胞悬液, 然后以 $250\times g$ 离心 5 分钟。除去上清液, 于细胞团块中加入预加热到 42°C 由 $0.1\times$ SSC 和 0.1% Triton 组成的 10 ml 洗涤溶液。搅拌溶液直到细胞成为单细胞悬液, 然后以 $250\times g$ 离心 5 分钟。去掉上清液并将细胞团块再次悬浮于 0.2 ml 由加在 $1\times$ PBS 中的 0.0025% 伊凡斯氏兰组成的溶液中。

用 Coulter Instruments 制造的 Profile II™ 分析细胞。该装置使用 488 nm 氩激光, 并使用针对 FL1 的 525 nm 带通过滤光片, 以及针对复染剂的 635 nm 带通过滤光片。各被检样品中, 首先分析含阴性探针的样品, 并设定四分状态以使落入右上四分之一

范围的细胞少于 0.01%。然后在如分析带阴性探针样品的完全相同参数下分析含阳性探针的样品。因为已准确地设定了四分状态，并且对两样品均已作了完全相同的处理，所以在右上四分之一记录的细胞数目（0.01%以上）作为阳性记录。

将大约 500,000 个 H9 细胞等分到两个试管中并按上述方法固定。向其中一份等分样品中加入含有阳性探针（28S）的杂交溶液，并向另一份中加入含相当于以上表 4 中所列阳性探针同样大小之阴性探针（NR）的杂交溶液。然后进行杂交，洗涤和流动细胞计数。

使用流动细胞计数法测得的结果是：当使用 28S-25-AL 探针时，99% 以上的细胞为阳性，当使用 28S-21-AL 探针时，0.01-99% 的细胞为阳性；当使用其他探针时，不到 0.01% 的细胞为阳性。此外，如检测平均 LFL1，得到如表 5 所示的结果。

表 5

信号 (平均 L F L 1)

长度	N R	2 8 S	Fold Diff
6	. 3 2 2	. 3 7 0	1 . 1
8	6 . 4	. 4 4 1	Neg
1 0	. 4 2 2	. 3	. 7 0
1 2	. 3 2 1	. 2 3 1	. 7 2
1 5	. 3 2 7	. 3 7 3	1 . 1
1 8	. 4 0 7	. 3 3 9	. 8 3
2 1	. 2 8 1	. 6 1 6	2 . 2
2 5	. 3	5 0 . 0	1 6 8

实施例 3

通透增强剂和信号增强剂

流动细胞计数

使用 Coulter Profile II 流式细胞计数仪进行流动细胞计数。用 F I T C 作为探针染料, L F L 3 的滤光片是 6 3 5 n m 波长通过滤光片, L F L 1 的滤光片是 5 4 0 b p 滤光片; 激发波长为 4 8 8 n m。根据需要调整 P M T 1 和 P M T 3 的定位装置。当染料部分是荧光素时, 一般是将 P M T 1 设定为 1 1 0 0, P M T 3 设定为 9 0 0, 且使用 1 5 % 的颜色补偿 (P M T 1, P M T 3)。

杂交混合物“HC”是有下列组分的溶液：5×SSC、15×Ficoll/PVP、0.16M硫酸钠缓冲液（PH6）、1mg/ml剪切的鲑鱼精子DNA、10%Triton X-100、0.4M异硫氰酸胍、30%（V/V）甲酰胺、10mM乙二胺四乙酸（EDTA）、1.5%聚乙二醇（PEG）、25mM DTT（二硫苏糖醇）和5至10μg/ml（微克/毫升）探针。

杂交混合物“HC-DMSO”是含有下列组分的溶液：5×SSC、15×Ficoll/PVP、0.16M磷酸钠缓冲液（PH6）、1mg/ml剪切的鲑精子DNA、10%Triton X-100、0.4M异硫氰酸胍、30%（V/V）甲酰胺、10mM EDTA、1.5%PEG、25mM DTT、10%（V/V）DMSO、以及5-10μg/ml探针。上文中，500×Ficoll/PVP是5g Ficoll400型（分子量为400,000的聚蔗糖）加5g PVP用水稀释到总体积100ml；15×Ficoll/PVP是500×Ficoll/PVP用水作15/500稀释得到的。

为在流式细胞仪中进行流式细胞检测，将细胞悬浮在1×PBS溶液中。

28S RNA探针是对核糖体RNA特异的，并具有本文所述28S-25-AL的核苷酸序列。NR探针是对干细菌（而不是真核细胞）中的氮还原酶基因特异的，其具有本文所述NR-25-AL的核苷酸序列。

“玻片原位制备和杂交程序”

1）将细胞悬浮在固定液（3体积乙醇加1体积甲醇）中并使用Cytospin 装置离心转移到玻片上。

2) 将含DNA探针(25 μ l)的试验溶液(只含杂交混合物HC或与一种或多种作为增强剂的被试化合物混合)加在细胞上并盖上盖玻片。

3) 将载玻片于90℃下加热5分钟以使DNA变性,然后于46℃保温30分钟进行杂交。

4) 用已在42℃下平衡的1号洗涤溶液洗细胞一次,用在42℃经平衡的2号洗涤液细胞10次。

5) 在细胞上加固定溶液(溶在1×PBS中的50%甘油(V/V))加核染色剂Hoechst(#33258; 1 μ g/ml)并盖上盖玻片。

6) 在对使用若丹明衍生物滤光片有荧光检测能力(激发波长567nm,发射波长584nm)的Olympus BH10显微镜下观察杂交信号。

“液体原位细胞制备和杂交程序”(步骤1~6):

1. 在溶液F中固定细胞,然后将细胞重新悬浮在2×SSC中。

2. 从溶液中离心分离出细胞并重新悬浮在试验溶液(只含杂交混合物HC或与作为增强剂的一种或多种被试化合物合并)中。

3. 42℃下杂交30分钟后,由试验溶液中离心分离出细胞,以在42℃预加热的1号洗涤溶液中洗细胞。

4. 然后在42℃预加热的2号洗涤溶液中洗细胞。

5. 将细胞重新悬浮在含有作为复染剂之0.002%锥虫蓝的1×PBS溶液中。

6. 使细胞通过流动细胞计数仪并制作“计数对LFL1”的直方图(“计数”是指细胞计数)。以该直方图作为确定平均LFL1

的基础。

(a) 按下述方法证明加入烷烃(异三十烷)和其他化合物的影响:

原位制备细胞玻片然后杂交。杂交混合物由8体积HC-DMSO、1体积异三十烷、1体积异三十烷及1体积其他化合物组成。其他化合物是下列化合物之一:十二醇(醇)、 β -环糊精(糖)、棕榈酸异丙酯(脂肪酸酯)、1,2-丙二醇(醇)、吡咯烷酮(内酰胺)、六甲基二硅氧烷(有机硅烷)或油醇(醇)。对照样品中,用1体积水代替1体积其他化合物。结果,所有样品中DMSO和异三十烷的浓度分别是8%和10%(V/V)。

就对照样品来说,观察到玻片信号强度为2。与对照玻片相比,依据是否强度分别为对照样品玻片的0.5、1.0、1.5和2倍,而评估所有其它玻片额定值为1、2、3或4。

b) 在原位液体杂交试验中,向试验溶液中除加入DMSO以外还有其他附加化合物的条件下,测定其对探针信号强度的影响。用流式细胞计数法分析数据。

遵循液体原位细胞制备和杂交法。所用细胞是Hela细胞。所用探针是28S RNA探针的NR探针。各探针均有借助Aminolink交联接头分子(氨基基;购自Applied Biosystems Inc.)连接到其5'末端上的FITC部分。

28S RNA探针是对核糖体RNA特异的靶特异性探针;用其测得的荧光代表来自靶结合之探针、非特异性结合之探针的荧光和细胞分子之自发荧光的总和。NR探针是对植物核酸序列特异的,且在本实施例中,用其测得的荧光代表来自非特异性结合之探针的荧光

和自发荧光的总和。在本实验中，杂交混合物由 9 体积 H C - DMSO 加上 1 体积附加化合物组成。在对照样品中，以 1 体积水代替 1 体积附加化合物。结果，所有样品中 DMSO 的浓度都是 9 % (V / V)。

表 6

杂交混合物中的附加化合物	28S RNA 探针	N R 探针	28S RNA/NR 之比
水	6 . 0 7 0	0 . 1 3 7	4 4
1 0 % 吡咯烷酮	1 0 . 1 9	0 . 1 3 3	7 7
1 0 % β - 环糊精	9 . 5 9 3	0 . 1 3 5	7 1
1 0 % 六甲基二硅氧烷	7 . 4 2 6	0 . 1 2 6	5 9
1 0 % 棕榈酸异丙酯	8 . 0 5 7	0 . 1 4 0	5 8
1 0 % 丙二醇	8 . 2 2 7	0 . 1 4 8	5 6
1 0 % 十二醇	4 . 8 0 4	0 . 1 4 2	3 4
1 0 % 油酸	3 . 6 4 3	0 . 1 4 2	2 6
1 0 % 油醇	0 . 7 3 1	0 . 1 3 6	-
1 0 % 异三十醇	0 . 6 1 1	0 . 1 2 3	-

比例 2 8 S / N R 是分别用 2 8 S RNA 探针和 N R 探针所观察到的平均 L F L 1 的比例。“2 8 S RNA 探针”和“N R 探针”栏中所示结果分别是用 2 8 S RNA 和 N R 探针观察到的平均 L F L 1。

这些结果是四次独立实验的平均值。表 6 中的结果显示与单用 9

% DMSO 所得结果相比，吡咯烷酮、 β -环糊精、六甲基二硅氧烷、棕榈酸异丙酯和丙二醇与 9% DMSO 合用增加了信号亮度。如果单用 DMSO 对信号亮度来说，9% 是最佳或接近最佳的 DMSO 浓度。

使用 10% 异三十烷或 10% 油醇可使之从溶液中沉淀出来，并在两种情况下都产生双相混合物。结果两种情况下都明显降低了信号强度。

(c) 遵循液体原位细胞制备和杂交法。在检测合用 DMSO 和异三十烷对荧光探针信号的影响的基础上，检测再与第三种化合物合用后进一步提高的增强效果。

几乎在两种情况下，杂交混合物由 9 体积 HC-DMSO、0.5 体积异三十烷和 0.5 体积附加化合物组成。附加化合物是下列化合物之一：十二醇（醇）、 β -环糊精（糖）、棕榈酸异丙酯（脂肪酸酯）、1,2-丙二醇（醇）、吡咯烷酮（内酰胺）、六甲基二硅氧烷（有机硅烷）或油醇（醇）。一种情况是用水代替附加化合物从而杂交混合物便由 9 体积 HC-DMSO、0.5 体积异三十烷和 0.5 体积水组成。在对照样品中，混合物由 9 体积 HC-DMSO 和 1 体积水组成。结果在所有样品中都有 9% 大 DMSO (V/V)。若加异三十烷则比例为 5%，若有附加化合物亦为 5%。

测量使用分析物 RNA 分子特异性探针测得之信号的平均 LFL1 对使用 NR 探针测得之信号的平均 LFL1 的比例。

(d) 当附加化合物用十二醇、 β -环糊精、棕榈酸异丙酯、1,2-丙二醇、吡咯烷酮或六甲基二硅氧烷时，按照本实施例 (a) 部分所述方法，用人 Hepg2 细胞和 FITC 连接的人 Y 染色体 α -随体 DNA 特异探针测得其额定值为 4。用油醇得到额定值 3。用三乙

醇胺或对照材料(水)得到额定值2,用三乙醇胺得到额定值1。

(e)按照本实施例(c)部分所述的方法,使用 α -随体DNA探针检测,当既不存在异三十烷也不存在附加化合物时,随体探针的LFL1对NR探针的LFL1的比例为22,当存在异三十烷但不存在附加化合物时这一比例为37。此外,当存在异三十烷时,若附加化合物是吡咯烷酮这一比例为77。如附加化合物为棕榈酸异丙酯这一比例为52,如附加化合物为1,2-丙二醇这一比例为39,如附加化合物为 β -环糊精这一比例为39。

(f)按照本实施例(d)部分所述方法,使用人女性白血细胞(核型XX)和若丹明荧光标记的女性染色体HXR探针检测,当附加化合物是1,2-丙二醇、十二醇或棕榈酸异丙酯时信号强度为4,当附加化合物是吡咯烷酮、油醇、异三十烷或三十碳六烯时为3,当化合物是羟丙基环糊精或六甲基二硅氧烷时为2,对照组(以水代替附加化合物)为1。

(g)使用各添加指定浓度之DMSO、六甲基二硅氧烷(HEX)、异三十烷或聚乙二醇(PEG)的,含有62 μ l水、10 μ l10 \times 缓冲液(500mM KCl、100mM Tris PH8.4,溶于无菌蒸馏水中的1mg/ml明胶)、10 μ l2mM dNTP混合物(2mM GTP、2mM CTP、2mM ATP、2mM TTP,加在TE缓冲液PH7.5中),1 μ l100mM MgCl₂、1 μ l寡核苷酸1(β -球蛋白3'引物,所有引物均以0.416 μ g/ml溶于水中),1 μ l寡核苷酸1(β -球蛋白5'引物),10 μ l DNA(人总细胞DNA)和5 μ lTAQ聚合酶(2.5单位)的反应混合物,检测浓度为2%、4%、

6%、8%和10%的DMSO、HEX、异三十烷和PEG对PCR反应的影响。反应在热循环器中矿物油层下进行；90 μ l冻干的、并重新悬浮在12 μ l水和3 μ l电泳上样缓冲液中的反应混合物，然后在16聚丙烯酰胺凝胶上，于300伏、50安培电泳90。凝胶用溴化3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓染色，并对受激发的DNA结合的溴化3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓在UV光下照相。所有反应不取决于DMSO、HEX、异三十烷或PEG的量，在凝胶上产生不同的DNA带，即PCR产物的特征性带。根据上述结果，没有证据表明DMSO、六甲基二硅氧烷、异三十烷或聚乙二醇抑制了PCR反应。

(h) 将作为信号增强剂的各种化合物包含在固定溶液中，而不是在其悬浮于固定溶液中之前的悬浮它们的溶液内，借以证明这些化合物的有效性。原位杂交步骤后，洗细胞然后加入改进的固定溶液，并于显微镜下观察细胞的荧光信号。改进的固定溶液包含9体积固定溶液和1体积附加化合物，其中被试附加化合物是经试验具信号增强剂能力的化合物。附加化合物选自水（对照）、1,2-丙二醇、羟丙基环糊精、六甲基二硅氧烷、十二醇、吡咯烷酮、棕榈酸异丙酯、油醇、异三十烷和三十碳六烯（烯烃）。固定溶液由加在50%甘油（V/V）中的0.1%1,4-二苯胺（抗衰剂）和核着色剂Hoechst（#33258；1 μ g/ml）组成。

实施例4

本底降低剂的实例

本实施例的目的是确定某化合物是否具有本底降低剂功能，即它是否可降低由非特异性结合之探针分子和自发荧光分子发射的光量，

而不同样降低由特异性结合之探针分子发射的光量。

表 7. 所用的染料缩写名称

染料号	染料实际名称	缩写名称
1 2	萘酚蓝黑	萘酚 B 1 . B 1 K
1 3	宫殿坚牢黑 W A N	宫殿 F - B W A N
2 0	磺基若丹明 101 水合物	磺基若丹明 1 0 1
	异硫氰酸荧光素	F I T C

N R 是与细胞氮还原酶基因的一部分结合的 D N A 2 5 m e r ; 其核酸部分具有本文所述探针 N R - 2 5 - A L 的核苷酸序列。28S R N A 探针是与 2 8 S 核糖体 R N A 结合的 D N A 2 5 m e r , 其核酸部分具有本文所述探针 2 8 S - 2 5 - A L 的核苷酸序列。合成探针并在最后阶段将一氨基接头连接到 5 ' 末端磷酸上。然后将 5 ' 氨基基寡脱氧核苷酸偶联到 F I T C 染料分子 (得自 Molecular Probes) 上并用 H P L C 纯化之。

按实施例 3 中所述方法使用 Coulter. Profile II 流式细胞计数仪。

杂交混合物 H C 的组成同实施例 3 所述, 但其中改为加 3 % Triton X - 1 0 0 (V / V) 和 5 % P E G。

着色染料溶液含有下列组分: 在 1 × P B S 中的 0 . 0 0 2 % (W / V) 着色染料。一般说来, 如果使用了着色染料并被用作本底降低剂, 则其浓度为 0 . 0 0 0 2 % 和 0 . 1 0 % (W / V) 之间。

最好将细胞与本底降低化合物于 20°C 至 46°C 下保温 2 分钟至 8 小时。某些着色染料也是降低本底化合物。其中大多数也用作复染剂。

着色染料溶液具有与 F A S c a n 的流动缓冲液相同的组成。

H 9 细胞是得自人的淋巴瘤细胞系 (A T C C N o . C R L 8 5 4 3)。

为进行非特异性结合试验，使用 “ N R ” 探针。

为进行特异性结合试验，使用 “ 2 8 S ” 探针。

当使用 N R 探针时，发射光的量将是由两个光源发射之光的总量：非特异结合的探针分子和自发荧光的分子。换句话说，该发射光的量即是本底光。

当使用 2 8 S 探针时，发射光的量是三个光源发射的光和总和：特异结合的探针、非特异结合的探针和自发荧光的分子。换句话说，该发射光的量是靶特异性光加上本底光。

因此要找到一种能够降低本底光的化合物，就要找到有最大 A / B 比值的化合物，这里所说的 A 是当使用 2 8 S 探针时所发射的光量，B 是当使用 N R 探针时发射的光量。作为一个衡量标准，在不加入作为本底降低剂的化合物时测定 A / B 比例。

然而，有最大 A / B 比例是不够的，除此之外，还必须有足够高的探针特异性光量。探针特异性光的量即是 (A - B)。可以看出，当使用降低本底化合物时，探针特异性光的量仍是足以评估的。

按下述方法进行实验。

1. 在溶液 F 中固定未被感染的 H 9 细胞，然后再悬浮在 2 × S S C 中。

2. 将细胞从溶液中离心出来，并重新悬浮在杂交混合物 H C 中。

就所使用的探针来说，H C 混合物随样品的不同而异。所用三类探针：N R 探针、H I V 探针和 2 8 S R N A 探针。各探针均带有连接到探针寡核苷酸上的荧光素。

3. 4 2 °C 下杂交 3 0 分钟后，以 $250 \times g$ 离心 5 分钟，将细胞从杂交混合物中分离出来并在预加热到 4 2 °C 的 1 号洗涤溶液中洗细胞。

4. 然后在预加热到 4 2 °C 的 2 号洗涤溶液中洗细胞。

5. 将细胞重新悬浮在 $1 \times P B S$ 溶液或含有待试化合物（即检测其作为本底降低剂的有效性，在本实施例中该化合物也被看作是着色染料）的 $P B S$ 溶液中。

6. 用流式细胞计数仪计数细胞，并得到一个轴表示着色染料荧光（L F L 2 或 L F L 3），而另一轴表示探针荧光（L F L 1）的直方图。

步骤（6）中制得的是“计数对 L F L 1”直方图（“计数”是指细胞计数）。以此直方图为基础，确定待试化合物是否可用作有效的本底降低剂。还制作其他直方图和 F S / S S 曲线图，但不用作确定本底降低作用的基础；本文中没有给出这些图。

使用磺基若丹明 1 0 1 水合物（作为着色染料）和 N R 探针或 2 8 S 探针制得一系列计数对 L F L 1 直方图的实例。其结果总结于表 8 和 9 中。

表 8：图 1 中计数对 L F L 1 直方图所示结果的总结

组	细胞计数	细胞 P c t	平均 L F L 1
1	4 9 1 7	1 0 0 . 0	0 . 1 5 6 0
2	4 5 8 7	9 3 . 3	0 . 1 2 6
3	3 0 9	6 . 3	2 . 9 6 6
4	4	0 . 1	4 1 . 6 6

表 9：计数对 L F L 1 直方图所示结果的总结

组	细胞计数	细胞 P c t	平均 L F L 1
1	5 0 3 4	1 0 0 . 0	1 0 1 . 0
2	2	0	0 . 2 1 8
3	3 1	0 . 6	6 . 5 3 5
4	4 9 9 9	9 9 . 3	1 0 3 . 0

表 8 和 9 中，“细胞 P c t” 栏给出占总细胞计数的百分比；“L F L” 代表 “L o g 荧光”。

下表中总结了对各被试着色染料的检测结果。

表 10: 结果的总结

染料号	着色染料	各探针的平均值			
		N R	H I V	2 8 S	28S/NR 平均值比例
1 2	蔡酚B1. B1K	1.159	1.301	73.43	63.66
1 3	宫殿F-B WA	0.726	1.030	63.76	87.82
1 4	锥虫蓝	0.266	0.259	77.56	291.6
2 0	磺基若丹明101	0.156	0.143	101.0	647.4
P B S	磷酸盐缓冲盐水	64.5	38.73	246.1	3.82

“平均值比例，2 8 S / N R”是N R探针之平均值对2 8 S探针之平均值的比例。

从表10的右手栏(其中绘出上述A / B比例的度量)可以看出，所有四种被试的染料都增加了A / B比例。另外，探针特异性光的量(A - B)仍是显著的。因此表4中列出的所有染料均可用作本底降低剂。

实施例 5
游离基清除剂

表 11: 化合物的缩写

化合物	缩写
维生素 E (α-生育酚)	Vit, E
2, 2-二苯基-1-苦基偕肼肼水合物	2, 2, DIPH
2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧基	Tempo
异硫氰酸荧光素	EITC
二乙胺四乙酸	EDTA
二甲基亚砜	DMSO
二硫苏糖醇	DTT
聚乙烯吡咯烷酮	PVP
聚乙二醇 (分子量约 4000)	PEG 4000

本文使用 Coulter Profile II 流式细胞计数仪, 但应注意的
是, 进行 LFL 检测时使用 540 bp (.40) 滤光片, 即只允许波
长 520 nm 到 560 nm 的光通过的滤光片。LFL 3 的滤光片是
通过长于 635 nm 的滤光片, 即允许所有 635 nm 波长以上的光
通过。

本实施例中使用了下述溶液:

杂交混合物 HC 有本文已述及的成分, 并有下列改动: 使用 3%
Triton X-100 (V/V; Triton X-100 是聚氧乙烯醚的

醇衍生物，参见 Aldrich Chemical Co. 的 1990-91 目录）和 5% PEG 4000。

若在混合物中加入游离基清除剂，其优选浓度为 0.1% 至 10% (V/V)。

在使用加有核酸探针的杂交混合物时，杂交反应的温度较好在 30℃ 至 46℃ 之间；反应时间较好在 5 分钟至 16 小时之间。

ALEX 细胞是人细胞系。

NR 探针是本文已述及的荧光素标记的 NR-25-AL 探针。28S RNA 探针是本文已述及的对人 28S RNA 核苷酸序列特异的荧光素标记 DNA 寡聚体。两种探针均有连接到 5' 末端磷酸上的氨基基接头，然后该接头偶联到 FITC 分子上。

按下述方法进行第一次实验：

1. 在溶液 F 中固定细胞，然后将细胞再悬浮于 2×SSC 中。
2. 从溶液中离心分离出细胞并重新悬浮在杂交混合物 HC 中。根据所加游离基清除剂的不同（如果确实加入的话）HC 混合物随样品不同而异。
3. 42℃ 下杂交 30 分钟后，以 250×g 离心 5 分钟，从杂交混合物中分离出细胞并在预加热到 42℃ 的 1 号洗涤溶液中洗细胞。
4. 再在预加热到 42℃ 的 2 号洗涤溶液中洗细胞。
5. 将细胞重新悬浮在 1×PBS 溶液中。
6. 在流式细胞计数仪上计数细胞，并得到一个轴表示自发荧光 (LFL3) 而另一轴表示探针荧光 (LFL1) 的直方图。

步骤 (6) 中得到的是：“计数对 LFL1” 直方图（“计数”是指细胞计数）。以此直方图作为确定待检化合物是否为有效的自发

荧光降低剂的基础。还产生了其他的直方图和 FS/SS 曲线图，但不将它们作为确定自发荧光降低作用的基础；本文没有显示这些图。

表 11：使用游离基清除剂的平均 LFL 1 和 LFL 3

加入的化合物	平均 LFL 1	平均 LFL 3
无	7.92	0.22
Vit. E	0.501	0.119
2, 2, DIPH	17.27	0.863
Tempo	3.23	0.181
苯硫酚	1.69	0.138

表 11 中“加入的化合物”是加入 (Vit. E 之类液体，为 5% (V/V) 浓度，固体为 5 g / 100 ml) 到试验混合物中的化合物。

因加入游离基清除剂引起之自发荧光降低作用的显示量是使用前述混合物测得的平均 LFL 1 强度和使用混合物加游离基清除剂测得的 LFL 1 强度之差。另一显示量则是只使用混合物测得的 LFL 3 强度和使用混合物加游离基清除剂测得的平均 LFL 3 强度之差。结果显示，Tempo，苯硫酚和维生素 E 是游离基清除剂，结合本实施例所用荧光吸收-发射波长相结合情况下也是有效的自发荧光降低剂。另一方面，结果显示 2, 2 DIPH 在这些条件下则不能用作自发荧光降低剂。2, 2, DIPH 无效可能不是由于它不降低自发荧光，

而是由于它是发射光正处于本实施例所监测之波长处的荧光化合物。
用游离基清除剂 V i l . K 也观察到相似的情况。

在第二项实验中，实验程序基本上与第一项实验相同，但用未被感染的 H 9 细胞代替 A L E X 细胞，并且加在 H C 混合物中的 N R 探针或 2 8 S R N A 探针的浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。N R 探针是对不存在于人细胞中的细菌氮还原酶基因特异的。该探针被用作阴性对照。

2 8 S R N A 探针是对人 2 8 S R N A 序列特异的。

结果示于表 1 3 中。

表 1 3

探针	H C 混合物中有无 V i l . E	L F L 1
N R	无	1 3 . 2 7
N R	有	8 . 8 6
2 8 S	无	2 5 1
2 8 S	有	2 3 1

结果显示，杂交混合物中存在维生素 E 可使不希望有的本底水平（N R 造成的）降低约 3 3 %，而只导致用靶特异性探针（2 8 S，R N A）测得的信号水平降低 8 %。

本文实施例的方法可以作下述一点或多点改变：在 $100 \mu\text{l}$ 混合物中加入 $5 \mu\text{l}$ 1 M （即 1 摩尔浓度）D T T 和 $5 \mu\text{l}$ 蛋白酶 K（ $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ）溶液，并例如于 42°C 下杂交反应 5 分钟，然后于 95°C 下杂交 5 分钟，再于 42°C 杂交 2 分钟。

实施例 6

探针类似物的使用

表 B 和 C 显示用 F I T C 标记的特异于 H 9 - (未被感染的) 和 H 9 + (H I V 感染的) 细胞中之 H I V 序列的探针测得的结果。表 4 所示结果是在流动细胞计数期间, 在含细胞溶液中加入或不加伊凡斯蓝时测得的。

表 B

混合物	H9-	H9+
流动	12	226
0.05% NG	11	232
0.05% ATCA	8	216

表 C

混合物	无伊凡斯蓝		伊凡斯蓝	
	H9-	H9+	H9-	H9+
流动	18.9	189	0.127	128
0.1% NG	19.7	226	0.133	145
0.1% ATCA	12.4	210	0.125	146
1% NG	19.1	213	0.133	146
1% ATCA	20.3	137	0.212	121

结果显示浓度为 0 . 0 5 % 和 0 . 1 % 的 A T C A 可有效地降低

本底。结果还显示，在流动细胞计数期间存在伊凡斯蓝的情况下，当使用napachrome green 和ATCA时显示信号增加。

实施例 7

一硫化寡核苷酸在磷酸盐缓冲液中的反应

将200 μ g干燥的寡核苷酸溶解在100 μ l 50 mM磷酸盐缓冲液(PH 7.0)中形成第一溶液。然后将1 mg碘乙酰氨基荧光素与100 μ l无水DMF(即100%DMF)合并成第二溶液。将两溶液混合在一起并振荡过夜。如此使寡核苷酸与碘乙酰氨基荧光素的比例为1:5。保温过夜后用乙醇和3 M乙酸钠沉淀标记的寡核苷酸。然后使该粗材料过PD-10柱以除去游离染料。收集所需级分，然后在真空下除去液相，并用HPLC纯化该粗材料。

实施例 8

在磷酸盐缓冲液中合成多硫化的寡核苷酸

将200 μ g干燥的寡核苷酸溶解在100 μ l 50 mM磷酸盐缓冲液(PH 7.0)中以形成第一溶液。使1 mg碘乙酰氨基-荧光素与100 μ l无水DMF合并得到200 μ l反应混合物。将两溶液混合在一起并振荡过夜。如此导致反应混合物中的寡核苷酸对乙酰氨基荧光素的比例为1:5。使1 mg碘乙酰氨基荧光素再次与100 μ l无水DMF合并，然后取其100 μ l与200 μ l反应混合物合并。再于400 μ l反应混合物中加入100 μ l 50 mM磷酸盐缓冲液，并使反应继续进行6小时。用实施例7中所述的方法分离产物。

实施例 9

间隔硫连接的染料分子对50 mer的影响

用荧光素-乙酰氨基部分在核苷间(核苷之间)连接磷的硫原子

处分别标记对 28S 和 NR 特异的 50mer 寡脱氧核苷酸。

28S 50mer 的序列是：

GCCTCACCGGGTCAGTAAAAACGATCAGAGTAGTGGTATTTACCGGC

NR 50mer 的序列是：

CGCCTCGGAGTTGAAGGGATGTTTCCCTGTGAGACGTACCATGGAAGGGT

使用 H9 细胞系，用无核酸酶磷酸盐缓冲盐水 (PBS、0.36M NaCl、0.003M KCl、0.008M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001M KH_2PO_4) 洗培养的细胞，并以产生清楚分离之细胞浓度制成单细胞悬液。离心沉淀细胞并弃去上清液。将细胞再悬浮在 40% 乙醇、50% PBS 和 10% 冰醋酸中，并于 4℃ 下放置 12 至 16 小时。固定后从溶液中离心去除细胞；在 1×PBS 中洗并重新悬浮于 2×SSC (1×SSC 是 0.15M NaCl、0.015M 柠檬酸钠，PH 7.0；2×SSC 是 0.30M NaCl、0.030M 柠檬酸钠 PH 7)。细胞要立即使用。

对于每种探针，都将大约 500,000 个 H9 细胞等分到两个试管内并按上述方法固定。将含有阳性探针 (28S) 的杂交溶液加到其中一份样品中，并将含有相当于如上表所列阳性探针同样大小之阴性探针 (NR) 的杂交溶液加到另一份样品中。然后杂交、洗涤并进行流动细胞计数。

为进行杂交，向离心沉淀的细胞中加入 50 μl 杂交混合物，该混合物由 30% 甲酰胺、5×SSC、0.16M 磷酸钠缓冲液 (PH 7.4)、1 μg/ml 剪切的 DNA、3% (V/V) Triton X-100 (聚氧乙烯醚的醇衍生物；参见 Aldrich Chemical Co.

1990-91目录), 5% PEG 4000 (聚乙二醇4000)、25 mM DTT (二硫苏糖醇)、0.4 M 异硫氰酸胍、15×Ficoll/PVP 和探针 (2.5 μg/ml) 组成的杂交混合物。上文中, 500×Ficoll/PVP 是 5 g Ficoll 400 型 (分子量400, 000的聚蔗糖) 加上 5 g PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 溶于水中至总体积为 100 ml、15×Ficoll/PVP 表示 500×Ficoll/PVP 已用水作了 15/500 的稀释。

杂交在 42℃ 下进行 30 分钟。

杂交后, 将细胞放在已加有预加热到 42℃, 由 0.1×SSC、0.4 M 异硫氰酸胍和 0.1% Triton 组成之洗涤溶液的 15 ml 锥形试管中。搅拌该溶液直到成为单细胞悬液, 然后以 1000×g 离心 10 分钟。除去上清液并在细胞沉淀团块内加入预加热到 42℃, 含 0.1×SSC 和 0.1% Triton 的 10 ml 洗涤溶液。搅拌该溶液直到成为单细胞悬液。将细胞以 1000×g 离心 10 分钟。除去上清液并将细胞沉淀团块重新悬浮于 0.2 ml 含 0.0025% 伊凡斯蓝 (在 1×PBS 中) 的复染溶液中。

在 Coulter Instruments 制造的 Profile II™ 上分析细胞。该装置使用 488 nm 氦激光, 对于 FL1 以 525 nm 带通过滤光片, 对于复染剂以 635 nm 带通过滤光片。

将连续的硫原子分隔开的核苷的数目在各探针之间有所不同。在硫-硫间有 4 个核苷间隔时观察到的信号量, 仅与硫原子间有 6、8 或 10 个核苷时获得的信号量差不多大。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.